

**Struktur- und Funktionsanalysen von pilzlichen
Zellwandproteinen der SUN- und CFEM-Proteinfamilien**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Chemie

der Philipps-Universität Marburg

Hochschulkennziffer 1180

vorgelegt von

Vitali Kalugin, M.Sc. Chemie

aus Losowoje (Kasachstan)

Marburg 2017

Erstgutachter: Prof. Dr. Lars-Oliver Essen (Fachbereich Chemie)

Zweitgutachter: Prof. Dr. Hans-Ulrich Mösch (Fachbereich Biologie)

Einreichungstermin: _____

Prüfungstermin: _____

Marburg 2017

Die Untersuchungen zur vorliegenden Dissertation wurden in der Zeit vom September 2012 bis zum Mai 2017 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Lars-Oliver Essen an der Philipps-Universität Marburg durchgeführt.

Erklärung

Ich erkläre, dass zum heutigen Tage keine Promotion an einer anderen Hochschule als der Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Chemie, versucht wurde.

Ich versichere, dass meine vorgelegte Dissertation

*„Struktur- und Funktionsanalysen von pilzlichen Zellwandproteinen
der SUN- und CFEM-Proteinfamilien“*

selbst und ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen als die in ihr angegebenen Quellen oder Hilfsmittel verwendet, alle vollständig oder sinngemäß übernommenen Zitate als solche gekennzeichnet sowie die Dissertation in der vorliegenden oder ähnlichen Form noch bei keiner anderen in- oder ausländischen Hochschule anlässlich eines Promotionsgesuchs oder zu anderen Prüfungszwecken eingereicht habe.

Ort/Datum

Unterschrift

*“Das erste, das der Mensch im Leben vorfindet,
das letzte, wonach er die Hand ausstreckt,
das kostbarste, was er im Leben besitzt,
ist die Familie. “*

A. Kolping
1813-1865

1 Einleitung	15
1.1 Das Reich der Pilze	15
1.1.1 <i>Aspergillus fumigatus</i>	15
1.1.2 <i>Candida albicans</i>	16
1.1.3 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	17
1.2 Die pilzliche Zellwand – Aufbau und Funktion	18
1.2.1. Die Zellwandinnenfläche und die integritätsfördernde Funktion von β -Glukanen	19
1.2.2 Proteine innerhalb der pilzlichen Zellwandproteine	21
1.3 SUN-Proteine und deren Rolle bei der Zellwandremodellierung	23
1.4 Die große CFEM-Proteinfamilie - Vorkommen und Funktion	25
1.5 Zielsetzung	28
2 Material	29
2.1 Geräte	29
2.2 Verbrauchsmaterialien	30
2.3 Chemikalien	31
2.4 Saccharide und Oligosaccharide	32
2.5 Enzyme	32
2.6 DNA-Primer zur Genamplifizierung	33
2.7 DNA-Primer zur quantitativen Echtzeit-PCR (qRT-PCR)	34
2.8 Vektoren	34
2.8.1 pET-28a(+)-Vektor	34
2.8.2 pMK/pMA-Vektoren (<i>Life Technologies</i>)	34
2.8.3 Eingesetzte Plasmide zur Expression in <i>E. coli</i>	35
2.9 Verwendete Bakterienstämme	36
2.9.1 <i>E. coli</i> DH5 α	36
2.9.2 <i>E. coli</i> SHuffle T7 Express	36
3 Methoden	37
3.1 Bioinformatische Methoden	37
3.1.1 Phylogenetische Analyse	37
3.1.2 Enzym-Funktions-Netzwerke (EFI-EST)	38
3.1.3 Molekulardynamische Simulationen	39
3.2 Molekularbiologische Methoden	41
3.2.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)	41
3.2.2 PCR-Aufreinigung	41
3.2.3 DNA-Restriktionsverdau	42
3.2.4 Agarosegelelektrophorese	42
3.2.5 Geextraktion von DNA-Fragmenten	42
3.2.6 Ligation	43

3.2.7 Herstellung chemisch kompetenter Zellen	43
3.2.8 Transformation chemisch kompetenter Zellen	44
3.2.9 Übernachtskulturen (ÜNK)	44
3.2.10 Plasmid-Präparation	44
3.3 Proteinbiochemische Methoden	46
3.3.1 Testexpressionen	46
3.3.2 Analytischer Zellaufschluss	46
3.3.3 Präparative heterologe Expression	47
3.3.4 Präparativer Zellaufschluss	47
3.4 Proteinaufreinigung	48
3.4.1 Ni-NTA-Affinitätschromatografie	48
3.4.2 Gelfiltrationschromatographie	48
3.5 Proteinanalytische Methoden	49
3.5.1 SDS-PAGE Analyse	49
3.5.2 Western Blot	49
3.5.3 <i>Glycan array screening</i>	50
3.5.4 Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC)	51
3.5.5 Interaktionsuntersuchungen mittels Oberflächenplasmonresonanz	52
3.5.6 CD-Spektroskopie	54
3.5.7 H/D-Austausch Massenspektrometrie (HDX-MS)	55
3.5.8 Fluoreszenzmikroskopie	58
3.6 Bestimmung der dreidimensionalen Struktur von Proteinen	59
3.6.1 Auswahl und Optimierung geeigneter Kristallisationsbedingungen	60
3.6.2 Saccharid- <i>Soaking</i> von Proteinkristallen	62
3.6.3 Röntgendiffraktion an Proteinkristallen	63
3.6.4 Datenprozessierung	64
3.6.5 Phasenbestimmung zur Lösung der Proteinstruktur	65
3.6.6 Verfeinerung der Strukturmodelle	66
3.7 Visualisierung und Illustration wissenschaftlicher Ergebnisse	67
3.7.1 PyMOL	67
4. Ergebnisse	69
4.1 SUN-Proteine	69
4.1.1 Phylogenetische Untersuchung von SUN-Proteinen	69
4.1.2 Molekularbiologie, Expression und Aufreinigung von SUN-Proteinen	72
4.1.3 Kristallisation und Strukturlösung von <i>ScSun4C</i> -Varianten	74
4.1.4 Strukturelle Untersuchung der SUN-Domäne auf Basis von <i>ScSun4C</i>	76
4.1.5 Funktionelle Untersuchung von SUN-Domänen	80
4.1.6 HDX-MS Analytik von <i>ScSun4C</i>	83
4.2 CFEM-Proteine	90
4.2.1 Phylogenetische Analyse von CFEM-Proteinen	90
4.2.2 Expression und Aufreinigung von CFEM-Proteinen	94
4.2.3 Funktionelle und Strukturelle Charakterisierung von CFEM-Proteinen	96
4.2.4 Zeitabhängige UV/Vis-Spektroskopie von CFEM-Proteinen	98

5 Diskussion	103
5.1 Die Sekretion von <i>S. cerevisiae</i> SUN-Proteinen	103
5.2 Zwei Domänen-architektur zur Bindung komplexer Glukanstrukturen	104
5.3 Funktionsmodelle von SUN-Proteinen in pilzlichen Zellwänden	108
5.3.1 Modell 1: Die SUN-Domäne als reversible Ankerstelle innerhalb der Zellwand	108
5.3.2 Modell 2: Eine neuartige Funktion als β -1,3-Glukan Helikase	109
5.3.4 Der S/T-reiche Bereich von SUN-Proteinen als potentielle Protein-Interaktionsfläche	111
5.4 Ein Ausblick zu SUN-Proteinen	112
5.5 Die Funktionsvielfalt von pilzlichen CFEM-Proteinen	113
5.6 Die Oligomerisierung von Pga7-Orthologen als funktionelles Motiv	115
5.7 Zeitabhängige Bindung von Pga7-Orthologen an Hämin-B	116
5.8 Ausblick zu CFEM-Proteinen	117
6 Literaturverzeichnis	119
7 Anhang	131
7.1 <i>Glycan array screening</i> von <i>ScSun4C</i> , <i>PpCcw14A</i> und <i>ScCcw14A</i>	131
7.2 HD/X MS-Untersuchung von <i>ScSun4C</i>	132
7.4 SPR Bindungsuntersuchung von <i>ScSun4C</i> -Varianten	162
7.5 CD-Spektren von SUN-Proteinen	164
7.6 UV/Vis-Referenzspektrum Hämin-B	164
7.7 MEGA6 – Einstellungen für die phylogenetische Rekonstruktion	165
Danksagung	168

Zusammenfassung

Pilzliche Organismen stellen eine der artenreichsten Lebensformen der Erde dar. Die ausgesprochen hohe Anzahl unterschiedlicher Vertreter spiegelt hierbei die große Diversität der besetzten ökologischen Nischen wieder. Ermöglicht wird die Anpassung beispielsweise an widrige Umweltfaktoren durch einen komplexen und hoch funktionellen Zellwandaufbau. Diese 50 - 200 nm dicke Schicht setzt sich aus Chitin und β -1,3- / β -1,6-Glukanen zusammen die weitere organismenspezifische Modifikationen beinhaltet. Die β -1,3-Glukane innerhalb dieses Netzwerks bilden tripelhelikale Überstrukturen und sorgen in Verbindung mit dem daran gebundenen Chitin, zu einem stabilen Grundgerüst. Innerhalb der stark verzweigten Architektur der pilzlichen Zellwand erfüllt eine Vielzahl an sekretierten Proteinen diverse Aufgaben.

In dieser Arbeit stehen die Familien der SUN- und CFEM-Proteine im Fokus. SUN-Proteine sind bei der Remodellierung der β -1,3-Glukanstrukturen innerhalb der pilzlichen Zellwand beteiligt. Für die C-terminale SUN-Domäne aus *Saccharomyces cerevisiae* konnte über SPR und HDX-MS Untersuchungen die Bindungsstelle gegen Laminarin, einem β -1,3-Glukan mit β -1,6-Glucoseverzweigungen [7:1], gezeigt werden. Molekulardynamische Simulationen für die Interaktion von ScSun4C gegen Curdlan, einem unverzweigten β -1,3-Glukan, zeigten hierbei ein stabiles Bindungsverhalten über 100 ns. Auf diesen Erkenntnissen aufbauend können zwei Funktionsmodelle der C-terminalen SUN-Domäne geschlussfolgert werden. Die SUN-Domäne als neuartige, reversible Docking-Einheit innerhalb des β -Glukanmaterials, oder als Tripelhelix entwindende Glukanhelikase. Letztere sorgt für ein Entwinden der thermodynamisch begünstigten Tripelhelix und einem dadurch schnelleren Abbau durch endo-/exo-Glukosidasen. AFM-Untersuchungen können weiterhelfen die beschriebenen Modelle zu verifizieren.

CFEM-Proteine können nach phylogenetischen Analysen in mehrere distinkte Gruppen, mit unterschiedlichen Aufgaben und Funktionen unterteilt werden, die durch zusätzliche strukturbasierte Erkenntnisse bestätigt werden können. Pga7-Orthologe sind bei der Akquisition von Hämin aus Hämoglobin und dessen Weiterleitung ins Zellinnere beteiligt. Die Bindung gegen Hämin zeigt hierbei eine zeitliche Abhängigkeit, sodass ein zweistufiger Bindungsprozess mit einer strukturellen Reorganisation geschlussfolgert werden kann. Für Ccw14-Orthologe, die bei der Quervernetzung der Zellwand beteiligt sind, konnte hingegen keine Häminbindung beobachtet werden. Die Interaktion von Ccw14-Orthologen zu endo-Glukosidasen wie Bgl2 könnte hierbei wichtige Fragen zur gruppenspezifischen Funktion beantworten.

Summary

The fungal kingdom is one of the most diverse lifeforms found on earth. Hereby the manifold number of different subspecies reflects their populated ecological niches. The fungal cell wall is a complex and highly functional organelle that allows adaptation to adverse environmental conditions like change in osmolarity. This 50 – 200 nm thick layer is formed by a basic set-up from chitin and β -1,3-/ β -1,6-glucans and further species specific content. Within this heavily cross-linked network the β -1,3-glucans form triple helical structures that are then linked to the chitin moiety. This core-content of β -glucans and chitin is primarily responsible for the robustness of the fungal cell wall. In the cross-linked space of the inner cell wall an enormous number of secreted proteins perform various roles.

This work will focus on the two groups of SUN- and CFEM-proteins. SUN-proteins play a role during the cell wall remodelling process of β -1,3-glucans. SPR and HDX-MS experiments for the C-terminal SUN-domain of *Saccharomyces cerevisiae* showed active binding towards Laminarin, a β -1,3-glucan with additional β -1,6-glucose linkage [7:1]. Molecular dynamic simulations of ScSun4C with bound curdlan, an unlinked triple helical β -1,3-glucan, showed stable binding during the whole calculation of 100 ns. These binding results combined with structural information of the C-terminal SUN-domain lead to two hypothetical models. The SUN-domain as a novel, reversible β -glucan docking unit or as a triple helical β -glucan unwinding domain. This glucan helicase like behaviour unwinds hereby the triple helical form and passes one single β -glucan strand through its tunnel. This single β -glucan then can be easily hydrolysed by endo-/exo-glucanase. Atomic force microscopy could verify this glucan helicase functionality

CFEM-Proteins show in phylogenetic analysis distinct groups with cluster specific functions. That is in accordance with structural information from the protein structure of *Candida albicans* Csa2 a Pga7-like protein. This group of Pga7-like proteins is involved in heme-iron acquisition from haemoglobin and the transport inside the cell. A time dependent heme binding mechanism could be observed for Pga-like proteins with a two-step binding mode and a structural reorganisation within the binding pocket. Ccw14-like CFEM-proteins lack the heme-binding functionality. This group plays a role in cross-linking the inner cell wall compartment. The interaction of Ccw14 from *Saccharomyces cerevisiae* with Bgl2, an endo-glucanase could solve the mystery about this group.

1 Einleitung

1.1 Das Reich der Pilze

Pilzliche Organismen stellen eine der artenreichsten Lebensformen der Erde dar. Nach bisherigen Erkenntnissen konnten hierbei weit über 80.000 unterschiedliche Gattungen beschrieben werden, wobei nach Schätzungen von HAWKSWORTH 1.5 Millionen unterschiedlichen pilzlichen Arten auf der Erde vorkommen^{5,6}. Eine genauere Eingrenzung der Anzahl wird jedoch vor allem durch verborgene Arten erschwert, die innerhalb einer homogenen Gruppe keine morphologischen Unterschiede aufweisen und dadurch bisher einfach untergegangen waren. Eine große Hilfe war hierbei die phylogenetische Einteilung auf Grundlage von Genomsequenzierungs-Projekten⁷.

Die ausgesprochen hohe Anzahl verschiedener pilzlicher Arten spiegelt die große Diversität aller besetzten ökologischen Nischen wieder. Saprotrophe Pilze spielen eine wichtige Rolle bei der Zersetzung von organischem Material, wie beispielsweise bei verwesendem Holz, indem diese neben einem invasiven Wachstum zusätzlich Enzyme in ihre Umgebung sekretieren um hierüber Nährstoffe aufnehmen zu können⁸. Im Gegensatz zu den von toter organischer Materie lebenden Pilzen, ist eine große Gruppe von pathogenen oder parasitären Pilzen vorhanden. Diese greifen jedwedes Leben an, seien es Bakterien, Pflanzen, andere Pilze oder Tiere inklusive des Menschen. Getrieben werden diese Organismen durch ihre Suche nach für sie überlebensnotwendigen Ressourcen⁹. In Bezug auf den Menschen treten hierbei die meisten Infektionen von pathogenen Pilzen bei immunsupprimierten Menschen auf, da diese, unter anderem wegen eines reduzierten Repertoires an Phagozyten, nicht mehr alle Eindringlinge beseitigen zu können^{10,11}. Wiederum andere Pilze leben in mutualistischer Symbiose mit Insekten, Flechten, der Mykorrhiza oder Pflanzen zusammen¹². Aufgrund dieser Symbiose konnte sich wiederum die Biodiversität von Pilzen erhöhen, da hierüber neue Habitate mit neuen Ressourcen geschaffen wurden, die es galt zu besiedeln¹³. In dieser Arbeit erfolgte die Charakterisierung essentieller, pilzlicher Zellwandproteine überwiegend aus den Organismen *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans* und *Saccharomyces cerevisiae*, sodass im Folgenden auf diese *Ascomyceten* näher eingegangen werden soll.

1.1.1 *Aspergillus fumigatus*

Eukaryota - Fungi - Ascomycota - Pezizomycotina - Eurotiomycetes - Eurotiales - Trichocomaceae - Aspergillus

Aspergillus fumigatus ist ein saprotropher, filamentöser Pilz, der auf der Erde ubiquitär verbreitet ist. Aufgrund der Eigenschaft seine Konidien auf dem Luft- oder Wasserweg zu verbreiten, findet man diesen Pilz überwiegend im oberen Erdreich sowie auf verwesendem Laub oder Holz.

Dabei liegt seine Hauptaufgabe darin, den Kohlenstoff und Stickstoff des zu zersetzenden organischen Materials, auf dem er siedelt, zu recyceln. Dabei zeigt er selbst in einem Temperaturbereich von 50 °C Wachstum, wobei seinen Sporen (Konidien) selbst Temperaturen von 70 °C nichts ausmachen können¹⁴. *Aspergillus fumigatus* ist darüber hinaus als opportunistisches Pathogen bei immunsupprimierten Menschen in den letzten Jahren immer mehr ins Zentrum wissenschaftlicher Arbeiten gerückt. Schätzungen gehen von ungefähr zehn Konidien pro Kubikmeter Luft aus, sodass jeder Mensch täglich etwa 100 Konidien einatmet¹⁵.

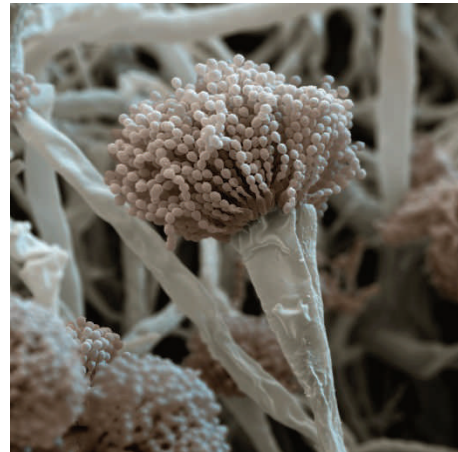


Abbildung 1: Der rauchgrüne Giesskannen-Schimmelpilz, *Aspergillus fumigatus* zeigt einen Konidienträger. Rasterelektronenmikroskopische Vergrößerung 1300:1. © eye of science, MECKES & OTTAWA.

Das Immunsystem eines gesunden Menschen kann auf diesen Angriff reagieren, sodass es zu keinen Erkrankungen kommt; anders verhält es sich bei immunsupprimierten Menschen, da bei diesen die Wahrscheinlichkeit erhöht ist, dass nicht alle Sporen phagozytiert werden und sich dann die 2-3 µm großen Konidien (Abbildung 1) in den Lungenbläschen festsetzen. Dieses kann von Allergien bis hin zu der Ausbildung einer Aspergillose führen, die in vielen Fällen zum Tod führt. Aktuelle Antimykotika zeigen gegen das äußerst invasive Wachstum und den äußerst stabilen Biofilm nahezu keine Wirkung^{16,17}.

1.1.2 *Candida albicans*

Eukaryota - Fungi - Ascomycota – Saccharomycetes - Saccharomycetales - Saccharomycetaceae - Candida

Candida albicans ist ein diploider pilzlicher Organismus der natürlich auf der menschlichen Schleimhaut, überwiegend im Mund und Enddarmbereich, vorkommt. Für den Fall, dass das Wirts-Immunsystem geschwächt ist, kann dieser Pilz ein pathogenes Muster entwickeln¹⁸. Dabei kann dieser Organismus die Haut, Schleimhaut, Lunge sowie das Herz befallen. *Candida albicans* ist zudem in der Lage aus einzelnen 10-12 µm großen Zellen Biofilme aufzubauen und sich dadurch gegen externe Umweltfaktoren oder den Wirtsorganismus zusätzlich zu schützen (Abbildung 2). Der sich neu ausbildende Biofilm besteht hierbei aus kleinen ovalen Zellen, den Blastosporen und länglichen tubusförmigen Hyphenzellen¹⁹. Diese produzieren um sich herum eine extrazelluläre Matrix, die aus Polysacchariden, sekretierten Proteinen

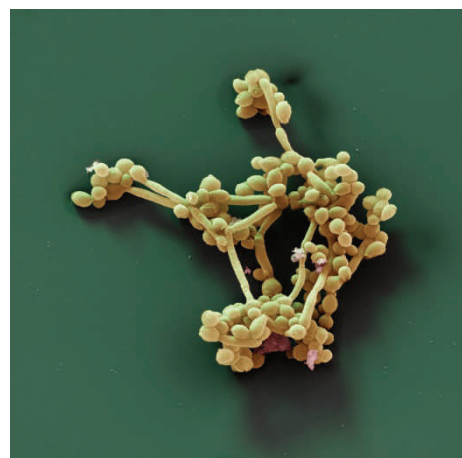


Abbildung 2: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines Zellverbundes von *Candida albicans*. Vergrößerung 1450:1. © eye of science, MECKES & OTTAWA.

beziehungsweise Nukleinsäuren aufgebaut ist. Mit ~87 % stellen Polysaccharide den Hauptanteil der Biofilmmatrix, wobei vorrangig verzweigte α -1,2- und α -1,6-Mannane assoziiert an β -1,6-Glukanketten gefunden werden können²⁰. Der Gehalt an β -1,3-Glucanen, die zu einem großen Anteil den Innenbereich der pilzlichen Zellwand bilden, ist in dieser Matrix sehr gering. Zudem können zusätzlich wirtsnahe Bakterien mit in dem Biofilm eingebracht werden um eine Immunantwort des Wirtssystems zu reduzieren^{21,22}.

1.1.3 *Saccharomyces cerevisiae*

Eukaryota - Fungi - Ascomycota – Saccharomycetes - Saccharomycetales - Saccharomycetaceae - Saccharomyces

Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* ist ein rundlicher, 4-6 μ m großer Mikroorganismus, der haploid als auch diploid vorkommen kann, wobei seine diploide Form deutlich häufiger vorgefunden werden kann (Abbildung 3). Diese diploiden Zellen sind zusätzlich in der Lage unter Stressbedingungen, wie sie bei einer Verknappung der Kohlenstoffressource, bei Hitze oder hoher Osmolarität eintreffen, sogenannte Pseudohyphen auszubilden. Dieser Phänotyp zeigt dann einen Zellenverbund, bei dem die neu gebildeten länglichen Zellen über ein Septum mit den Elternzellen weiterhin verbunden vorliegen²³. Man findet diesen Organismus häufig in Bereichen, wo Fermentationsprozesse ablaufen, wie auf der Oberfläche von Früchten oder in Weinkellern²⁴. *Saccharomyces cerevisiae* spielt eine bedeutende Rolle in der Lebensmitteltechnologie, da er sowohl unter aeroben als auch anaeroben Bedingungen leben kann. Anaerob liegt die Hauptaufgabe dieses Organismus in der Fermentation von Zuckern zu Alkohol, wie beispielsweise bei der Bierherstellung. Aerob findet dieser Organismus täglich Verwendung als Bäckerhefe, indem er den im Teig vorhandenen Zucker zu CO₂ und ATP veratmet. Das hier produzierte Kohlenstoffdioxid sorgt dann wiederum für das Aufgehen des Brotteigs.



Abbildung 3: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer sich teilenden *Saccharomyces cerevisiae* Zelle. Vergrößerung 12500:1. © eye of science, MECKES & OTTAWA.

Als Modellorganismus findet *Saccharomyces cerevisiae* in der Forschung breite Anwendung. Hierbei sind mehrere Laborstämme dieses Organismus in Verwendung. Der S288c-Stamm konnte durch MORTIMER im Jahre 1950 isoliert werden und wurde 1996 vollständig sequenziert²⁴. Aufgrund geringer Sporulationsraten und reduzierter Proteinproduktion bei Stickstoffmangel werden zusätzliche Laborstämme herangezogen²⁵. Ein Beispiel hierfür ist der Σ 1278b-Stamm, der über einen erweiterten Stickstoffmetabolismus verfügt und unter Stickstofflimitierung sogenannte Pseudohyphen ausbildet

²⁶

1.2 Die pilzliche Zellwand – Aufbau und Funktion

Pilze sind Experten bei der Besiedlung neuer ökologischer Nischen, da sie ihre Lebensweise sehr an aktuelle Umgebungsbedingungen anpassen können. Hierbei ist die pilzliche Zellwand ein hochdynamisches Organell mit einer Schichtdicke von 50 bis 200 nm. Die Zellwand erfüllt dabei mehrere Aufgaben gleichzeitig, da das Zellinnere gegen äußere Faktoren, wie mechanischen Stress bei ändernden osmotischen Bedingungen, dem Wirtsorganismus oder anderen Konkurrenten, geschützt werden muss. Zusätzlich stellt sie die erste Kontaktstelle des pilzlichen Organismus bei der Adhäsion an Oberflächen oder andere Zellen dar^{27,28}. All diese Punkte bedürfen auf der einen Seite einen modularen sowie rigiden Aufbau, auf der anderen Seite muss die Zellwand jedoch weiterhin flexibel genug bleiben und über ausreichend hohe Plastizität verfügen, um essentielle Zellprozesse wie Zellwachstum, Zellteilung oder die Ausbildung anderer Zellformen weiterhin zu ermöglichen. Erreicht wird dies durch einen Schichtaufbau bestehend aus Chitin, gefolgt von einem β -1,3- / β -1,6-glukanreichen Zellwandinnenbereich der nach außen hin über eine Schicht aus Mannanen abgeschlossen wird (Abbildung 4)²⁹.

Diesen Grundaufbau teilen alle pilzlichen Vertreter, wobei es jedoch abhängig von Organismus und Zellform zu Unterschieden innerhalb des Zellwandmaterials kommen kann. Die innere Zellwandmatrix von *Ascomyceten*, darunter fallen die Pilze *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* oder *Aspergillus fumigatus*, besteht aus einem elastischen sowie porösen Netzwerk aus β -1,3-Glukanenketten, die wiederum mittels β -1,6-Glukanketten verzweigt sind. Bezogen auf die Zellwandtrockenmasse beträgt dieser Teil 50 – 90 % zum Gesamtgewicht³⁰. Kürzere β -1,6-Glukanverzweigungen können in den meisten Hefen sowie bei filamentösen Pilzen gefunden werden. Diese fungieren als Dockingstellen, innerhalb der β -1,3-Glukanschicht, für die Verankerung von sekretierten Zellwandproteinen mit C-terminalem GPI-Anker und deren Präsentation auf der Zellwandaußenfläche (Abbildung 4a)³¹.

Zu diesem grundsätzlichen Aufbau zeigen die Konidien von *Aspergillus fumigatus* zusätzliche Erweiterungen. Hierbei wird die β -1,3-Glukanschicht durch eine α -1,3-Glukanschicht maskiert und zusätzlich die Genom-DNA durch Einbringen von Melanin in der Zellwand vor UV-Strahlung geschützt. Darüber hinaus ist die Zellwand mit einer Schicht bestehend aus Hydrophobinen umhüllt, damit die Konidien einfacher auf dem Wasserweg übertragen werden können (Abbildung 4c). Für denselben Organismus unterscheidet sich die Zellwandzusammensetzung der Hyphen deutlich von der eben beschriebenen Sporenform. Während die α -1,3-Glukanschicht im Zellwandinneren noch identisch ist, zeigen Hyphen von *A. fumigatus* Galaktomannane sowie Galaktosaminogalaktane (GAG) im äußeren Bereich (Abbildung 4d). Galaktomannane bestehen aus helikalen α -1,4-Mannoseketten, an die

einzelne Galaktosemoleküle α -6,1-glykosisch angeheftet sind. GAG setzt sich aus Galaktoseeinheiten und N-Acetylgalaktosamin (GalNAc) zusammen, was auch in Biofilmen gefunden werden kann³².

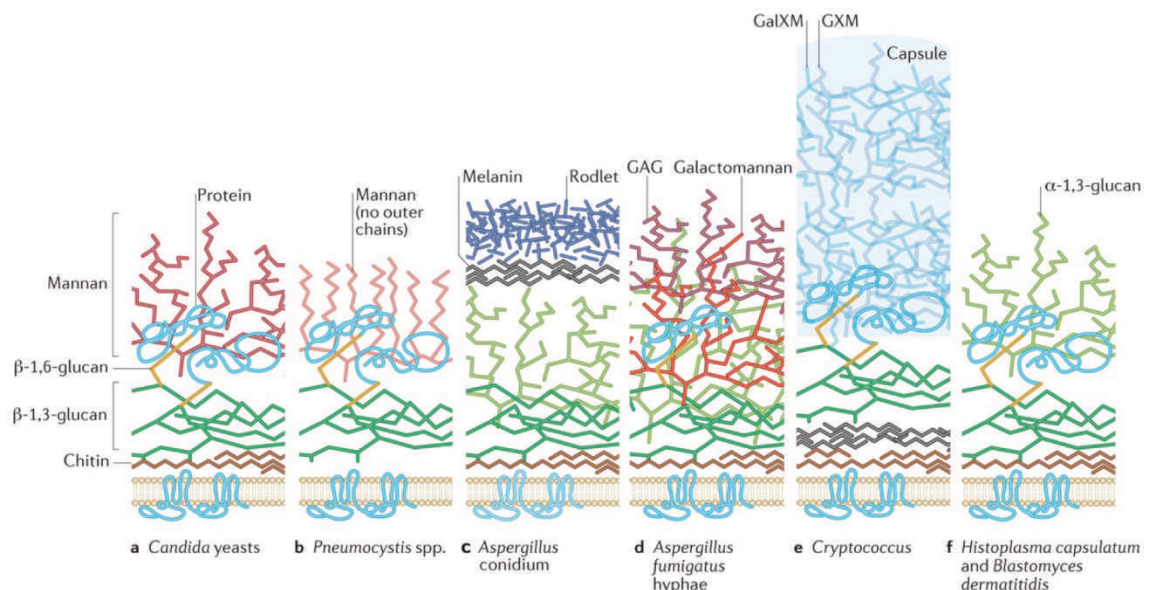


Abbildung 4: Schematischer Zellwandaufbau ausgewählter pilzlicher Vertreter, deren Kernbereich in Schichten aus einer Chitin-, β -1,3-Glucanen sowie β -1,6-Glucanen aufgebaut ist. A) Die äußere *Candida* Zellwand besteht aus O- und N-verknüpften als auch phosphorylierten Mannanen. B) Auf Grundlage genomischer Analysen und dem Fehlen von wichtigen Proteinen kann geschlossen werden, dass in *Pneumocystis* die Chitin-Schicht und N-glykosylierte Mannane fehlen. C) Die *Aspergillus* Spore verfügt über eine äußere Hydrophobinschicht und darunter eingelassenes Melanin. D) *Aspergillus* Hyphen zeigen α -1,3-Glucane im zellwandinneren und Galaktomannane sowie Galaktosaminogalactan (GAG) außen. E) Die *Cryptococcus* Zellwand ist zusätzlich von einer dicken Glukuronoxylomannan- und Galaktoxylo-mannan-Schicht umhüllt und im inneren mit einer Melaninschicht gegen UV-Licht geschützt. F) Die Hyphen von *Histoplasma capsulatum* verfügen über eine α -1,3-Glucanschicht, die vor einer Immunantwort des Wirtsorganismus gegen β -1,3-Glucane schützt. ERWIG und GOW³³.

Aufgrund der sehr hohen Plastizität und Variabilität bei der Zusammensetzung der pilzlichen Zellwand sind nach aktuellem Kenntnisstand keine genaueren Daten über den Polymerisierungsgrad der jeweiligen Glukanketten, deren ausgebildete Struktur sowie der genaueren Verzweigungen vorhanden.

1.2.1. Die Zellwandinnenfläche und die integritätsfördernde Funktion von β -Glucanen

Ausgehend von Chitin, einem Polymer aufgebaut aus N-Acetylgalaktosamin, werden wasserunlösliche Fibrillenstrukturen gebildet. Diese Strukturen zeigen aufgrund der Schichtenpackung kristalline Eigenschaften³⁴. Aktuell ist keine Methode vorhanden, deren Auflösungsvermögen groß genug ist, um den Aufbau der β -1,3-Glucane innerhalb der pilzlichen Zellwand zu untersuchen. Daher soll auf Grundlage von *in vitro* Ergebnissen Modelle von theoretisch möglichen Überstrukturen zusammengestellt werden.

β -1,3-Glucane kommen aufgrund ihrer modularen Bauweise in den unterschiedlichsten Längen (engl. *dense of polymerisation*, DP) vor, wobei diese mit zunehmender Länge immer wasserunlöslicher werden. Untersuchungen der Protonaustauschraten bei Deuterierungsexperimenten zeigen für die Hydroxyprotonen am C4-Atom der Glucose einen verminderten Austausch (Abbildung 5A). Hierbei

nimmt die Reduktion der Austauschraten der C4 Hydroxyprotonen mit zunehmender DP zu, was anhand einer zusätzlich ausgebildeten Sekundärstruktur erklärt werden kann³⁵. Dies ist in guter Deckung zu der Kristallstruktur von Curdlan, einem β -1,3- Glukanpolymer ohne Seitenverzweigungen, bei dem sich drei einzelne Stränge zu einer linksgängigen tripelhelikalen Überstruktur zusammenlagern³⁶. Selbige tripelhelikale Struktur konnte mit Hilfe von ^{13}C -NMR Isotopenshift-Experimenten für Laminarin gezeigt werden³⁵. Laminarin ist ein industriell hergestelltes Zellwandextrakt aus *Laminaria digitata*, dem Fingertang. Hierbei zeigt Laminarin neben dem β -1,3-Glukanaufbau zusätzliche β -1,6-Glukanverzweigungen (Abbildung 5B). Dies verdeutlicht, dass auch verzweigte β -Glukane hoher DP bevorzugt Überstrukturen ausbilden^{37,38}.

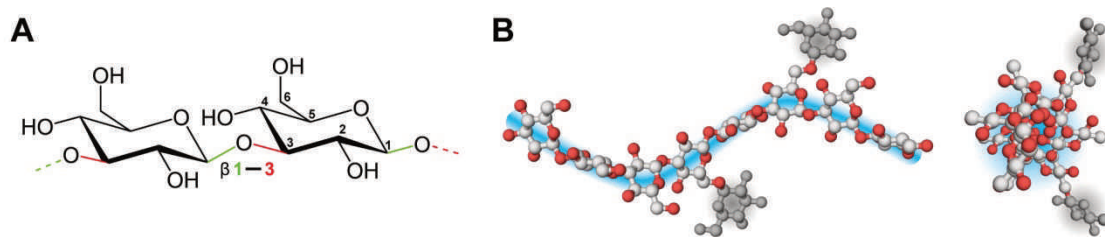


Abbildung 5: A) Molekülstruktur eines β -1,3-Glukans. B) Linksgängige Helixstruktur eines einzelnen Laminarinstrangs (DP8). Die Hauptkette besteht aus β -1,3-Glukanen (blau) wobei 1,6-Verzweigungen senkrecht zur Haupttraktionsachse weggehen (grau).

Spektroskopische Untersuchungen mittels FRET von Schizophyllan haben gezeigt, dass die tripelhelikalen Überstrukturen ausgesprochen stabil sind und sich unter Zugabe von NaOH die Enden in Einzelstränge teilweise entwinden, ohne jedoch die gesamte Helix aufzulösen. Dieser reversible Prozess führt nach einer Neutralisation der Lösung wieder zur Ausgangsform, einem vollständig tripelhelikalen β -1,3-Glukan³⁹.

Diese teilweise entwundenen Außenbereiche des tripelhelikalen β -1,3-Glukans verfügen über freie, nicht reduzierte Enden, sodass nach LEUNG *et al.* diese Aldehydgruppen eine Kondensationsreaktion mit den Aminogruppen des N-Acetylglukosamin eingehen können. Die daraus resultierende kovalente Bindung über Schiff'sche Basen verankert die Tripelhelix auf dem Chitingerüst (Abbildung 6)⁴⁰. Ermöglicht wird dies durch die Anwesenheit von Deacetylasen innerhalb der Zellwand. In *Candida albicans* liegen hierbei ~5% des vorhandenen Chitins in der deacetylierten Chitosanform vor. Die Chitin-Deacetylierung sorgt für eine erhöhte Flexibilität des Polymers und schützt zudem vor feindlichen Chitinasen^{41,42}. Die verbleibenden offenen Enden können theoretisch wie-

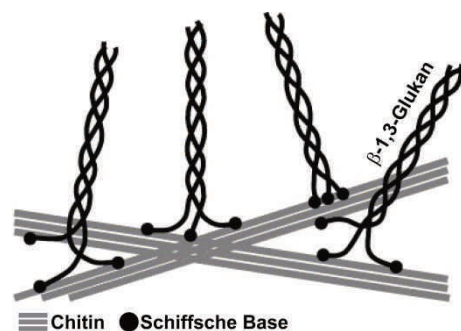


Abbildung 6: Schematische Illustration der inneren pilzlichen Zellwandverknüpfung. Bündel von kristallinem Chitin (grau) bildet ein Netzwerk, an das tripelhelikale β -1,3-Glukane über Schiff'sche Basen kovalent gebunden vorliegen. Abbildung nach LEUNG.

derum mit weiteren offenen Enden anderer Tripelhelizes oder anderen Lagen aus Chitin in Wechselwirkung treten^{42,43}.

1.2.2 Proteine innerhalb der pilzlichen Zellwandproteine

Eine Vielzahl biosynthetischer Prozesse findet innerhalb der pilzlichen Zellwand statt. Hierbei sind der aktive Transport von Hämin durch Pga7-Orthologe ins Zellinnere, das Remodellieren einzelner Zellwandkompartimente durch SUN-Proteine oder das Abfangen von schädlichen Hyperoxiden durch Sod-Proteine nur einige der vielen ablaufenden Prozesse (Abbildung 7)⁴⁴⁻⁴⁶.

Die Auflistung aller pilzlichen Zellwandproteine von *S. cerevisiae*, *C. albicans* und *A. fumigatus* anhand einer grafischen Darstellung mittels eines EFI-EST-Sequenzähnlichkeitsnetzwerkes verdeutlicht die Vielzahl unterschiedlicher Proteingruppen innerhalb der pilzlichen Zellwand (Abbildung 7). Ein besonderer Schwerpunkt dieser Arbeit liegt in der Remodellierung von Zellwandstrukturen, sodass im Folgenden auf prominente Vertreter diesbezüglich näher eingegangen werden soll.

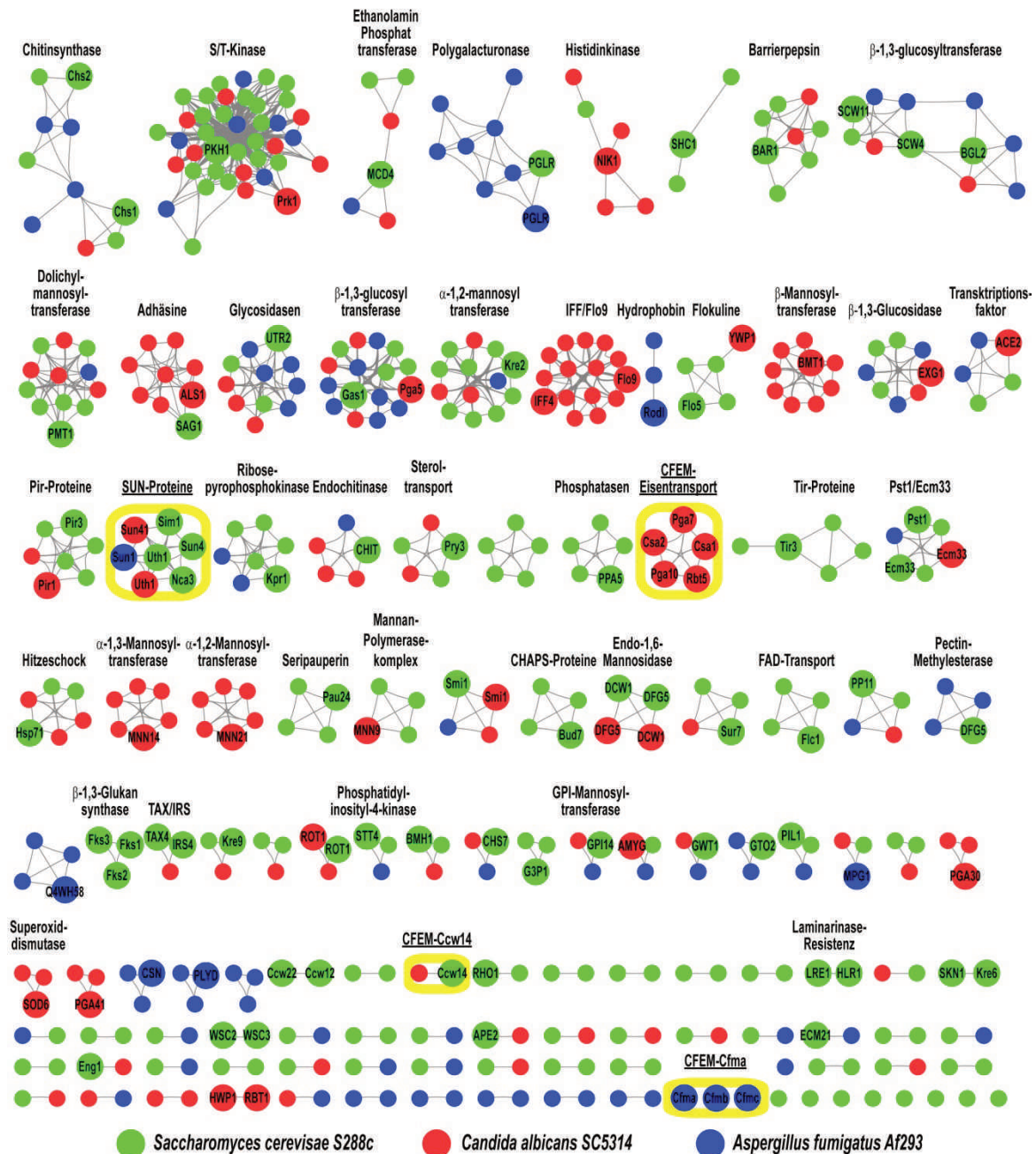


Abbildung 7: EFI-EST Zusammenstellung für die pilzlichen Zellwandproteine von *S. cerevisiae* (grün), *C. albicans* (rot) und *A. fumigatus* (blau). Die Sequenzen wurden in der Uniprot-Datenbank über folgendem Suchbegriff: ["cell wall" AND organism: "s.o."] gesammelt und zusammengefügt. Die EFI-EST Einstellungen waren: *E-Value*=5, *Fraction*=1, *Alignment Score*=15, Anzahl Sequenzen=729, Anzahl Verknüpfungen=1832. Ein gelber Rahmen grenzt die in dieser Arbeit bearbeiteten Proteingruppen ein.

1.3 SUN-Proteine und deren Rolle bei der Zellwandremodellierung

Eine Gruppe von Zellwandvernetzern stellen Pir-Proteine (engl. *proteins with internal repeats, Pir*) dar. Die Proteine setzen sich hierbei aus sieben bis acht, sich wiederholenden Einheiten von 18-19 Aminosäuren zusammen. Strukturell lagern sich diese über O-Ester an die Hydroxygruppen über deaminierte Glutaminseitenketten an^{47,48}.

Eine weitere Gruppe von Proteinen, die für das Remodellieren der Zellwand verantwortlich ist, ist die SUN-Proteinfamilie. SUN-Proteine kommen fast ausschließlich in Ascomyceten wie z.B. *S. cerevisiae*, *C. albicans* oder *A. fumigatus* vor. In *S. cerevisiae* sind fünf Paraloge, Sim1, Uth1, Nca3, Sun4 und Ymr224w, vorhanden. In *C. albicans* ist Sun41 eines der häufigsten Zellwandproteine, das bei Sekretomuntersuchungen gefunden werden kann⁴⁹. Neben der Aufgabe der Zellwandremodellierung werden SUN-Proteinen zusätzliche Funktionen wie die Zellalterung, der Mitochondrien-Biogenese, bei der Stressantwort und sogar bei der DNA-Replikation zugesprochen⁵⁰. Jedoch ist es wahrscheinlich, dass diese Funktionen fälschlich annotiert wurden und nur indirekt durch Uth1 und Nca3 bedingt sind^{51,52}. SUN-Vertreter sind hierbei allesamt sekretierte Zellwandproteine mit einem N-terminalen Signalpeptid (13 - 25 Aminosäuren) gefolgt von einem Serin-/Threonin-reichen Bereich geringer Komplexität (80 - 170 Aminosäuren). Daran knüpft sich die namensgebende Funktionsdomäne bestehend aus ~250 Aminosäuren, die eine paarweise Sequenzidentität von 45 – 85 % aufweist. Basierend auf phylogenetischen Untersuchungen von GASTEBOS und MOUASSITE konnte eine Einteilung von SUN-Proteinen in mindestens zwei Gruppen aufgezeigt werden^{45,53}. Gruppe I-Vertreter zeigen ein C_{X5}C_{X3}C_{X24}C-Motiv mit zwei vorhergesagten Disulfidbindungen, wobei der Konservierungsgrad für Gruppe II-Vertreter deutlich reduziert vorliegt.

Die Regulierung von SUN-Proteinen kann über Interaktionen innerhalb der Biogrid3.4 Datenbank näher bestimmt werden (Abbildung 8)^{54,55}. Diese Interaktionen können durch unterschiedliche Messmethoden erhalten worden sein, wobei hier jedoch ausschließlich auf physische Interaktionen eingegangen werden soll und genetische Untersuchungen außen vor bleiben. Die *affinity-capture* –

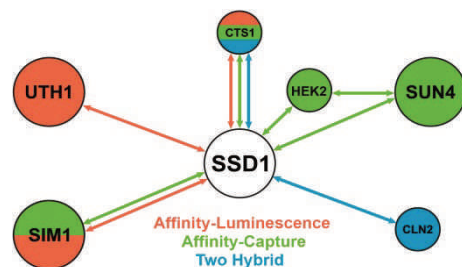


Abbildung 8: Das Interaktionsnetzwerk für SSD1 aus *S. cerevisiae* zeigt die Interaktion mit SUN-Proteinen.

Methode ist eine klassische Herangehensweise um einen Bindungspartner aus einem Zellextrakt spezifisch zu isolieren⁵⁶. Für die SUN-Proteine Sim1, Uth1 und Sun4 konnte eine Interaktion von deren mRNA zu Ssd1 gezeigt werden⁵⁷. Ssd1 (Uniprot-ID: P24276) ist ein zytosolisches, nicht sekretiertes pilzliches Protein, das hochkonserviert in Hefen vorkommt. C-terminal verfügt das

1250 Aminosäuren große Protein über eine RNaseII-artige Domäne, der jedoch die klassischen katalytische Reste fehlen⁵⁸. Ssd1 bindet mRNA von zellwandassoziierten Proteinen wie der Chitinase Cts1 oder SUN-Proteinen und steuert darüber die Translation der ribosomalen Proteine⁵⁹.

Deletionen von Gruppe I-Vertretern in *S. cerevisiae*, *Candida albicans*, *Schizosaccharomyces pombe* und *Aspergillus fumigatus* gehen mit schweren Schädigungen der Zellwand sowie einer veränderten Zellmorphologie einher⁶⁰⁻⁶². Beispiele hierfür sind in *S. cerevisiae* Δ SUN4- und in *C. albicans* Δ SUN41-Deletionsstämme, die eine eingeschränkte Abknospung der neugebildeten Tochterzellen aufzeigen (Abbildung 9).

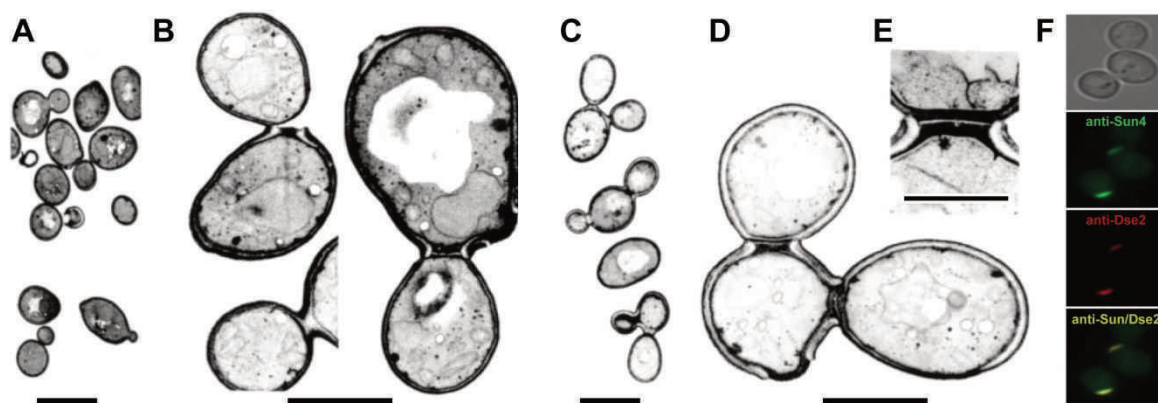


Abbildung 9: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von *S. cerevisiae* Zellen. A) und B) zeigen Wildtyp-Zellen. C), D) und E) zeigen Δ SUN4-Stämme mit dem Defekt der fehlenden Abschnürung von neugebildeten Tochterzellen. A), C) 5 μ m und B), D), E) 1 μ m. F) Kolokalisation von HA-ScSun4 und ScDge2-Myc. Abgeändert nach MOUASSI-TE und KUZNETSOV *et al.*^{53,63}.

Neben der fehlenden Abschnürung neugebildeter Tochterzelle, während der mitotischen Zellteilung, zeigen sich im Vergleich zum Wildtyp zusätzlich vergrößerte Zellen. Diese beginnen trotz der verbleibenden Verankerung an der Parentalzelle mit einem neuen Teilungszyklus (Abbildung 9C,D)⁵³. In Δ ACE2-defizienten Stämmen sind relevante Gene, die für die Auflösung des inneren Septumrings und die Remodellierung der Zellinnenmatrix verantwortlich sind, herunter reguliert. Auch SUN4-Gene werden hier mit runterreguliert, was sich in einem schneeflockenartigen, multizellulären Phänotyp zeigt^{64,65}. Lokalisationsuntersuchungen für ScSun4 haben zeigen können, dass eine deutliche Ankonzentrierung im Bereich der Sprossungsstelle beobachtet werden kann. Zudem konnte eine Ko-Lokalisation zwischen ScSun4 und ScDse2 bei Anwesenheit der Glukosidase ScEgt2 gezeigt werden (Abbildung 9F)⁶³.

Eine direkte Funktion als β -Glukosidase wurde für die SUN-Proteinfamilie bereits im Jahre 1998 durch CAPPELLARO aufgrund von Sequenzbeziehungen postuliert, jedoch blieb der experimentelle Beweis dafür bis 2013 aus^{66,67}. Hier konnte für die heterolog in *P. pastoris* rekombinanten Proteine

von AfSun1 aus *Aspergillus fumigatus* und CaSun41 aus *Candida albicans* eine zwar schwache aber dennoch erkennbare β -1,3-endoglucosidase Aktivität nachgewiesen werden⁴⁵.

Das Pflanzenpathogen *Ustilago viridens* verfügt über den SUN-Orthologen UvSun2, der zusätzlich eine Funktion als Virulenzfaktor erfüllen soll⁶⁸.

Auf diesen Erkenntnissen aufbauend stellt die SUN-Proteinfamilie ein interessantes Ziel für die Entwicklung antimykotischer Wirkstoffe, die direkt die Zellwandbiogenese treffen, dar.

1.4 Die große CFEM-Proteinfamilie - Vorkommen und Funktion

Die Proteinfamilie der CFEM-Proteine (engl. *common in fungal extracellular membranes*) besteht aus aktuell 3400 Sequenzen[§], die innerhalb 350 pilzlicher Organismen[§] vertreten sind. Näher eingegrenzt findet man diese nur in *Asco*- und *Basidiomycota*. Die CFEM-Domäne trägt acht hochkonservierte Cysteine, die nach einem domänenspezifischen Muster zueinander angeordnet sind und sich hierdurch von anderen cysteinreichen Domänen unterscheiden (Abbildung 10)⁶⁹.



Abbildung 10: Consensus-Motiv der CFEM-Domäne. X steht für variable Reste und im Index steht die Anzahl der Reste. Die Disulfidverbrückung ist auf Grundlage der Pga7-artigen Csa2-Proteinstruktur (PDB-ID: 4Y7S) mit schwarzen Linien angezeigt.

Eines der ersten charakterisierten Proteine mit einer CFEM-Domäne war Aci1 (Uniprot-ID: Q8J0Q3) aus *Magnaporthe grisea*, dem Erreger des Reisbrandes. Aci1 interagiert hierbei mit der Adenylatcyclase Mac1, das wiederum hauptverantwortlich für die Ausbildung von Appressorien ist, wodurch es diesem Pflanzenpathogen ermöglicht wird sich an Blätter und Stängel der Reispflanze anzuheften. Diese Aci1/Mac1-Interaktion zeigt eine Wechselwirkung von CFEM-Proteinen mit membrangebundenen Proteinen^{69,70}.

Zu den aktuell am besten charakterisierten CFEM-Proteinen gehört die Gruppe der Pga7-artigen aus *Candida albicans*. Diese Gruppe bestehend aus Pga7, Rbt5 und Csa2 ist bei der Akquirierung von Hämin aus der Umgebung beteiligt. Die Gruppe um KORNITZER *et al.* konnte die erste Proteinstruktur einer CFEM-Domäne kristallografisch bestimmen (Abbildung 10)⁷¹. Die Bindung an Hämin erfolgt hier über einen kegelförmigen, helikalen Grundkörper wobei der Asparaginsäurerest D80 an das Eisen des Protoporphyrinsystems koordiniert. Von oben wird das gebundene Hämin durch den N-Terminus deckelartig vor Solventeinfluss abgeschirmt, wobei die Aminosäure Y36 über π/π -Wechselwirkungen zusätzlich zum Hämin in Wechselwirkung tritt (Abbildung 11C).

[§] PFAM-Datenbank, Stand 20.02.2017

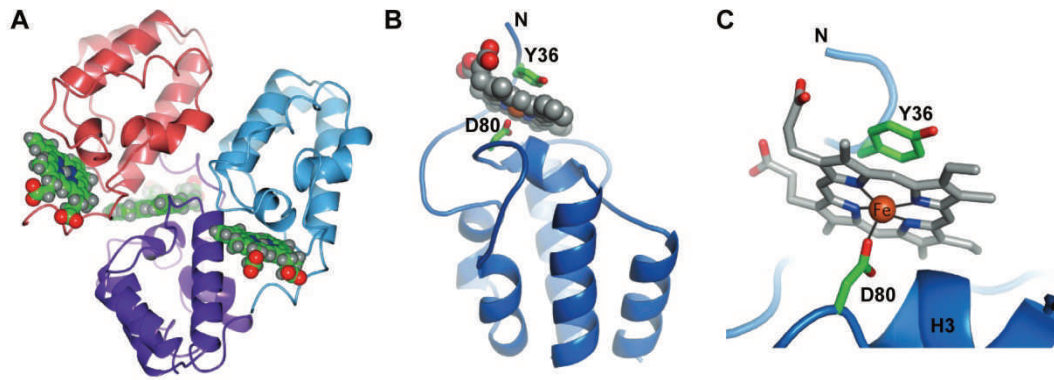


Abbildung 11: A) Die holo-Struktur von Csa2 (PDB-ID: 4Y7S) aus *Candida albicans* zeigt drei Moleküle pro asymmetrischer Einheitszelle und eine laterale Anordnung des gebundenen Hämins (grün) im trimeren Verbund. B) Darstellung eines einzelnen Csa2-Moleküls mit der Angabe der für die Bindung essentiellen Reste D80 und Y36. C) Vergrößerung der Bindungstasche⁷¹.

Pga7, Rbt5 und Csa2 binden Hämin mit Bindungskonstanten von $0.05 \mu\text{M}$, $5 \mu\text{M}$ und $0.3 \mu\text{M}$ ¹⁸. Zusätzlich konnten die Lokalisationen der einzelnen Vertreter zugeordnet und in einem Modell zusammengefasst werden (Abbildung 12). In diesem noch lückenhaften Modell muss zuerst die Oxidation des Fe(II)-Hämins zu Fe(III) innerhalb des Hämoglobins erfolgen. Danach kann das in die Umgebung sekretierte Csa2 das Fe(III)-Hämin aus dem Hämoglobin extrahieren. Der genaue Mechanismus hierzu ist jedoch nicht geklärt. Csa2 leitet danach das Hämin zur Zellwand weiter an Rbt5, was das Hämin weiter zum membranverankerten Pga7 abgibt (Abbildung 12).

Dieses Modell zeigt einen neuartigen Mechanismus wie pilzliche Pathogene, an das für sie lebensnotwendige Eisen innerhalb des Wirtsorganismus kommen können^{18,44,71}.

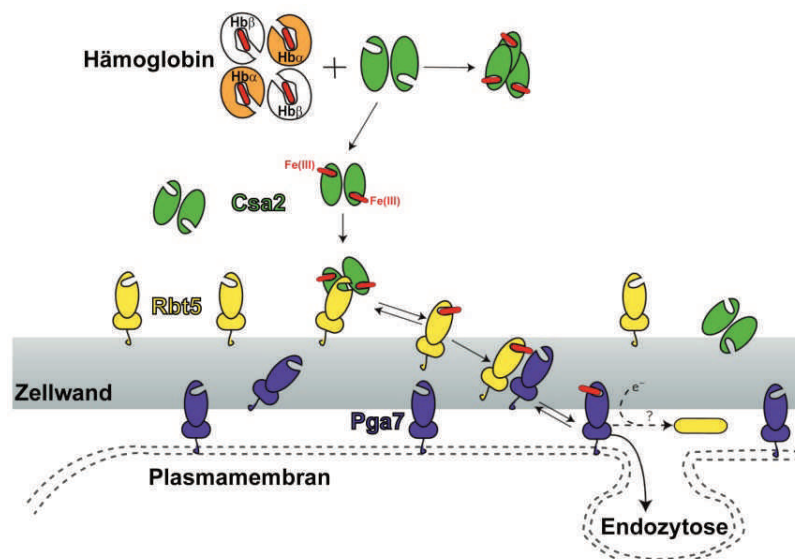


Abbildung 12: Modell zur Häminaufnahme durch Pga7-artige CFEM-Proteine in *Candida albicans*. Csa2 (grün) entzieht das Fe(III)-Hämin des Hämoglobins und leitet es weiter zur Zellwand an Rbt5 (gelb), dass das Hämin wiederum an das membranassoziierte Pga7 (lila) weitergibt und die Endozytose einleitet⁷¹.

Anders als beim pathogenen Organismus *Candida albicans*, mit seinen Pga7-artigen CFEM-Proteinen, ist *Saccharomyces cerevisiae* nicht in der Lage Hämin aus der Umgebung für sich als Eisenquelle zu nutzen⁷². Um an das essentielle Eisen zu kommen verwendet *S. cerevisiae* hierfür Siderophore der ARN-Familie^{73,74}. Nichtsdestotrotz verfügt *S. cerevisiae* über ein Protein mit einer CFEM-Domäne (Ccw14, Uniprot-ID: O13547), das den gewohnten Weg eines sekretierten pilzlichen Zellwandproteins durchläuft. Von der

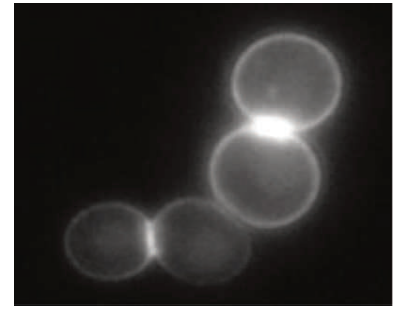


Abbildung 13: Mikroskopische Aufnahme von Ccw14-Venus exprimierenden *S. cerevisiae* Zellen¹.

Reifung innerhalb des endoplasmatischen Retikulums, über den vesikulären Transport zur Plasmamembran bis zum GPI-vermittelten Einbau an β -1,3-Glukane innerhalb der Zellwand^{1,75}.

Lokalisationsuntersuchungen von CASTILLON *et al.* zeigen neben der homogenen Präsenz des Ccw14-Venus Fusionsproteins innerhalb der pilzlichen *S. cerevisiae* Zellwand, eine deutliche lokale Anreicherung im Bereich des Septums (Abbildung 13)^{1,76}. Zur genaueren Funktion der Ccw14-artigen Proteingruppe ist jedoch bisher nichts Näheres bekannt.

Pth11 ist ein membrangebundenes GPCR-Protein aus *Magnaporthe grisea* und bildet eine weitere Gruppe von Proteinen die eine CFEM-Domäne tragen. Pth11 besteht hierbei aus sieben transmembranen Helizes und einer N-terminalen CFEM-Domäne (Abbildung 14)⁷⁷. Diese Gruppe von Proteinen kommt hauptsächlich in der ascomycetalen Unterklasse der *Pezizomycota* vor und fehlt gänzlich in *Basidiomycota* oder anderen Subphyla der *Ascomycota* wie beispielsweise den Hefen⁷⁸. Die Aufgabe dieser GPCR-Proteine liegt in der Bindung von exogenen Liganden, wobei hier eine sehr breite Variabilität abhängig von der Funktion vorhanden ist. Nach der Bindung erfolgt eine konformationelle Änderung des GPCR-Proteins wodurch eine Signalweiterleitung ins Zytosol gestartet wird⁷⁹. Pth11 ist mit verantwortlich für die Ausbildung von Appressorien und dadurch für die Pathogenizität des filamentösen Pilzes^{77,80}.

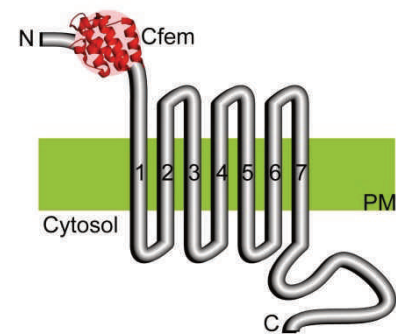


Abbildung 14: Schematische Darstellung des GPCR-Proteins Pth11 aus *Magnaporthe grisea*, mit einer N-terminalen CFEM-Domäne.

Neben den bereits genannten Orthologen von Mac1, Pga7, Ccw14, Pth11 CFEM-Proteinen sind darüber hinaus weitere Proteingruppen mit einer CFEM-Domäne vorhanden, wie beispielsweise Cfma- oder Mad1⁸¹. Diese CFEM-Proteinfamilie zeigt aufgrund der kleinen Domänengröße und der Möglichkeit weitere unterschiedliche Domänen modular zu Multidomänen-Proteinen zu kombinieren eine sehr breite funktionelle Präsenz im Reich der Pilze.

1.5 Zielsetzung

Die pilzliche Zellwand ist ein hochdynamisches Organell, in dem eine Vielzahl verschiedener Prozesse ablaufen. Hierbei erfüllen einzelne Proteinfamilien wichtige Funktionen. Im Rahmen dieser Arbeit sollen die Familien der SUN- und CFEM-Proteine aus *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans* und *Aspergillus fumigatus* näher untersucht werden. Methodisch sollen SUN- als auch CFEM-Proteine heterolog in *E. coli* produziert, extrahiert und abschließend isoliert werden. Die gereinigten, rekombinanten Proteine sollen dann weiter strukturell und funktionell charakterisiert werden.

Die Interaktion von SUN-Proteinen zu komplexen β -1,3-Glukanen soll mithilfe von Oberflächenplasmonresonanzmessungen bestimmt und die Bindungsstelle über HDX-MS Experimente strukturell näher eingegrenzt werden. Da komplexe β -1,3-Glukane in vielen Fällen für *in vitro* Experimente nicht zur Verfügung stellen sollen *in silico* Simulationen herangezogen werden um potentielle Modelle aufstellen zu können.

Um die große Anzahl an Proteinen, die eine CFEM-Domäne tragen besser einteilen zu können, soll eine detaillierte phylogenetische Charakterisierung dieser Proteinfamilie eine Basis für weitere Arbeiten schaffen. Dabei herausgebildete Gruppen, sollen näher strukturell und funktionell charakterisiert werden um Aussagen zu gruppenspezifischen Funktionen geben zu können.

2 Material

2.1 Geräte

Gerät	Bezeichnung (<i>Hersteller</i>)
Autoklav	T-Line (<i>Fedegari</i>), HV 110-L (<i>HMC</i>)
Brutschrank	BFED-53 (<i>Binder</i>)
CD-Spektropolarimeter	J-810 (<i>Jasco</i>)
Chromatografiesäulen	XK 16/60-Superdex 200/75 (<i>GE Healthcare</i>), His-Trap Ni-NTA (<i>Macherey Nagel</i>)
Chromatografiesysteme	ÄKTAPrime™/Purifier™ (<i>GE Healthcare</i>), NGC Quest™ 10 (<i>Bio-Rad Laboratories</i>)
Digitalkamera	D70s (<i>Nikon</i>)
Dokumentationssystem Agarosegele	Kamera (UVP), UV-Schirm (<i>Herolab</i>)
Dokumentationssystem Kristallisation	RockMaker, Rock Imager 1000 (<i>Formulatrix</i>),
Elektrophoresekammer für Agarosegele	Eigenbau (Philipps-Universität Marburg)
Elektrophoresekammer für SDS-PAGE	Mighty Small II SE250 / SE260 (<i>Hoefer</i>)
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 200M (<i>Carl-Zeiss AG</i>), Plan Apochromat Öl-Objektiv NA 1,4 (<i>Zeiss</i>), Orca ER (<i>Hamamatsu</i>), GFP- / Orca ER (<i>Hamamatsu</i>), GFP- / Rhodamin- / DAPI-Filter Set (<i>AHF2 Analysenteknik AG</i>),
Glasperlenmühle	FastPrep-24 (<i>MP Biomedicals</i>)
Hochdruckhomogenisator	French Press (<i>Aminco</i>), Hochdruckzelle (Feinmechanische Werkstätten, Philipps-Universität Marburg)
ITC-System	ITC ₂₀₀ (<i>MicroCal</i>)
Kristallisationsroboter	Cartesian HoneyBee 963 (<i>Genomic Solutions</i>)
Mikroskop	B601 (<i>Olympus</i>), MZ 8(<i>Leica</i>)
Oberflächenplasmonresonanz	Biacore T100 (<i>GE Healthcare</i>)
Peristaltikpumpe	P1 (<i>GE Healthcare</i>)
pH-Meter	Basic Meter PB-11 (<i>Sartorius</i>)
Photometer	Spektrometer V660 (<i>JASCO</i>), ND-1000 (<i>Nanodrop</i>), OD600 (<i>Implen</i>),
Pipetten	Research (<i>Eppendorf</i>)
Real-Time PCR-Cycler	Rotor-Gene Q (<i>Qiagen</i>)
Schüttelinkubatoren	Certomat IS (<i>Sartorius</i>), Controlled Environment Incubator/Shaker (<i>NBSC</i>), Multitron (<i>INFORS HT</i>)
Spannungsquelle für Elektrophorese	EPS 300 / 301 (<i>GE Healthcare</i>)
Waagen	PC2000 (<i>Mettler</i>), Toledo LabStyle 54 (<i>Mettler Toledo</i>)
Wasseraufbereitungssystem	Puranity PU20 (<i>VWR</i>)
Wasserbad	NK22 (<i>Haake</i>)
Zentrifugen	J2-21 M/E (<i>Beckmann</i>), J2-HS (<i>Beckmann</i>), Centrifuge 5810R (<i>Eppendorf</i>), Biofuge pico (<i>Heraeus</i>)

2.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Bezeichnung (<i>Hersteller</i>)
Dialysemembran	MF-Millipore Membran Filter 0.25 µm / Ø = 25 mm (<i>Merck Millipore</i>)
Einmalküvetten	Halb-Mikro Küvette 67.742 (<i>Sarstedt</i>)
Entsalzungssäulen	PD-10 Desalting Column (<i>GE Healthcare</i>), PD MiniTrap G25 (<i>GE Healthcare</i>)
ECL-Film	Amersham Hyperfilm ECL (<i>GE Healthcare</i>)
Kits: DNA-Reinigung	QIAquick PCR Purification Kit (<i>Qiagen</i>)
Gelextraktion	QIAquick MinElute Gel Extraction Kit (<i>Qiagen</i>)
Plasmidpräparation	QIAprep Spin Miniprep Kit (<i>Qiagen</i>)
Konzentratoren	Amicon Ultra-15 / Ultra-5 (<i>Merck Millipore</i>)
Kristallisationszubehör	96-well Innovaplate (<i>Innovadyne</i>), NEXTAL Screening Suites (<i>Qiagen</i>), SILVERseal / VIEWseal (<i>Greiner Bio-One</i>), Micro-Tools (<i>Hampton Research</i>), Kryozange (<i>Hampton Research</i>), Crystal Wand (<i>Hampton Research</i>)
Spritzenfilter	Filtropur S 0.2 / S 0.45(<i>Sarstedt</i>)
Sterilfilter	Ultrafree-MC (<i>Merck Millipore</i>)
Flaschenaufsatzfilter	0.20 µm (<i>Merck Millipore</i>)

2.3 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Acrylamid (30%)	<i>Roth</i>
Agar-Agar	<i>Roth</i>
Agarose	<i>Invitrogen</i>
Alexa Fluor® 488-TFP	<i>Life Technologies</i>
APS	<i>Fluka</i>
Bacto-Trypton	<i>Difco</i>
Bacto-Hefeextrakt	<i>Difco</i>
BSA	<i>Roth</i>
Coomassie-Brilliant-Blue R250	<i>Serva</i>
Decon-90	<i>Decon Laboratories Limited</i>
DNA Ladder Mix	<i>Fermentas</i>
Ethidiumbromid	<i>Roth</i>
Hämin-B	<i>Sigma-Aldrich</i>
Imidazol	<i>Merck</i>
IPTG	<i>Duchefa</i>
Kanamycin	<i>AppliChem</i>
2-Mercaptoethanol	<i>Roth</i>
PMSF	<i>Fluka</i>
SDS	<i>Serva</i>
Spectra™ Low Range Protein Ladder	<i>ThermoFisher Scientific</i>
TEMED	<i>Roth</i>
Tris	<i>Roth</i>
Tween-20	<i>Roth</i>
Virkon®	<i>Du Pont</i>

Nicht gelistete Chemikalien, sowie Verbrauchsmaterialien wurden in höchstmöglicher Qualität von den Firmen *Fluka*, *Merck*, *Roth* und *Sigma Aldrich* bezogen.

2.4 Saccharide und Oligosaccharide

Saccharid	Abkürzung	Hersteller
BetaGlucan (Gerste), low viscosity	-	Megazyme
Curdlan	Cur	Dextra Laboratories Ltd.
Carboxymethyl-Curdlan	CM-Cur	Megazyme
Glucose	Glc	Fluka
Laminari-biose	Glc β 1-3Glc	Dextra Laboratories Ltd.
Laminari-triose	Glc β 1-3Glc β 1-3Glc	Dextra Laboratories Ltd.
Laminari-tetraose	Glc β (1-3Glc β) ₃	Dextra Laboratories Ltd.
Laminari-pentaose	Glc β (1-3Glc β) ₄	Dextra Laboratories Ltd.
Laminari-hexaose	Glc β (1-3Glc β) ₅	Dextra Laboratories Ltd.
Laminarin	Lam	Dextra Laboratories Ltd.
4-Nitrophenyl- α -D-Glukose	pNP- α -Glc	Carbosynth
4-Nitrophenyl- β -D-Glukose	pNP- β -Glc	Carbosynth
4-Nitrophenyl- α -D-Galaktose	pNP- α -Gal	Carbosynth
2-Nitrophenyl- β -D-Galaktose	pNP- β -Gal	Carbosynth
4-Nitrophenyl-acetamido-2-deoxy- α -D-Glukose		Carbosynth
4-Nitrophenyl-acetamido-2-deoxy- β -D-Glukose		Carbosynth
4-Nitrophenyl- β -D-Ribose	pNP- β -Rib	Carbosynth
4-Nitrophenyl- β -D-Cellobiose	pNP- β -Cel	Carbosynth
4-Nitrophenyl- β -D-Mannose	pNP- β -Man	Carbosynth

2.5 Enzyme

Enzym	Aktivität	Hersteller
Albumin Fraktion V (<i>Rind</i>)		Carl Roth
DNAseI	3.000 U/mg	AppliCHem
endo-1,3- β -D-Glukanase (<i>Gerste</i>)	2.5 U/ μ L	Megazyme
exo-1,3- β -D-Glukanase (<i>Tr.virens</i>)	0.2 U/ μ L	Megazyme
Lysozym	50 mg/mL	Fluka
<i>Nde</i> I	20 U/ μ L	New England Biolabs
Phusion® HF DNA-Polymerase	2 U/ μ L	New England Biolabs
T4-DNA-Ligase	400 U/ μ L	New England Biolabs
<i>Sac</i> I-HF	20 U/ μ L	New England Biolabs
<i>Xho</i> I	20 U/ μ L	New England Biolabs

2.6 DNA-Primer zur Genamplifizierung

Innerhalb dieser Arbeit wurde vorrangig das pET28a(+)-Vektorsystem für die molekularbiologischen Arbeiten verwendet. Die Domänengrenzen der herzustellenden pilzlichen Zellwandproteine wurden unter Zuhilfenahme von bioinformatischen Tools (GlobPlot⁸², PSIPRED⁸³, Swiss-Model⁸⁴⁻⁸⁶) auf Proteinebene bestimmt und dann wiederum auf DNA-Ebene bei der Erstellung der Primer berücksichtigt. Die Restriktionsschnittstelle innerhalb der Primersequenz ist hierbei unterstrichen.

Bei Proteinvarianten, für die keine genomische DNA zur Verfügung stand, und somit keine Genamplifizierung mittels Primer-PCR möglich war, wurden synthetisierte Gene bei *ThermoFisher-Scientific* in Auftrag gegeben.

Primer		Sequenz (5' - 3')	Quelle
ScSun4(23-420)	fwd	GGGGGG <u>GCTAGC</u> TTGCCGTATGCGGCTGATATT	
	rev	GTGGTC <u>GCGGCCGC</u> TTAGTTGTATAGAACAACTTAGCTTTGCC	
ScSun4(147-420)	fwd	GCGGCTTC <u>ATTGAT</u> CGGTTATAGCAC	87-89
	rev	GTGGTC <u>CTCGAG</u> TTAGTTGTATAGAACAACTTAGCTTTGCC	87-89
CaSun41(24-418)	fwd	GGGGGG <u>CATATG</u> GACAATAAAAAACATCAAAAGAGAAGATTGTGAC	
	rev	GTGGTC <u>GCGGCCGC</u> CTAATTATACAAGACAAAGTCAGCTTCAC	
CaSun41(134-418)	fwd	GGGGGG <u>ATTAAT</u> ACCAATGGTATTGAAGGTGATTTG	1,88
	rev	GCTGTC <u>CTCGAG</u> CTAATTATACAAGACAAAGTCAGCTTC	1,88
CgSun41(155-427)	fwd	GGGGGG <u>ATTAAT</u> GGTGGTATCTACGGTGAC	1,88
	rev	GCTGTC <u>CTCGAG</u> TTAGTATAAGACAAACTTAGCCTTACC	1,88
CaRbt5(23-219)	fwd	GGGGGG <u>GCTAGC</u> GGTGATAATCCATACACTATTTTCCCAAGTGTTGC	
	rev	GTGGTC <u>GCGGCCGC</u> CTTAAGCTTCAACGGAACAGAAGCAACGT	
CaPga7(18-172)	fwd	GGGGGG <u>GCTAGC</u> TTTGGTACATACCCAAAAGTCCCTAAAAGTGC	
	rev	GTGGTC <u>GCGGCCGC</u> CTTATGTAGTTGTTGATTGAGCCGATTTCGGA	
ScCcw14(19-82)	fwd	TCAATACATATGGTCTTAGCAACACCTCCAG	88
	rev	GTTATT <u>CTCGAG</u> TCAATCGCCCAATGAAGC	88
PpCfem(22-96)	fwd	TCAATACATATGGCTGTTGCCACTCCACCG	88
	rev	GTGATG <u>CTCGAG</u> TCACTCATCAAGGTTAGCTTCAG	88

2.7 DNA-Primer zur quantitativen Echtzeit-PCR (qRT-PCR)

Die Bestimmung der Primerpaare für die qRT-PCR wurde mit Hilfe der Software Primer3Plus durchgeführt. Als feste Parameter wurden die Länge von 100 bp sowie die Schmelztemperatur von 60°C festgelegt. Als internes Referenz-Gen für *Saccharomyces cerevisiae* S288c wurde ACTIN (ActI) ausgewählt.

Primer		Sequenz (5' - 3')
ScSun4	fwd	ACCAGCGCCAAAGTTCAATG
	rev	ACCAGCGCCAAAGTTCAATG
ScActI	fwd	TTCTCCACCACTGCTGAAAGAG
	rev	AAGATTGAGCAGCGGTTTGC

2.8 Vektoren

2.8.1 pET-28a(+)-Vektor

Dieser Vektor wurde vorrangig im Rahmen der Dissertation für die Produktion von rekombinanten Proteinen eingesetzt. Die Transkription rekombinanter Proteine erfolgt hierbei über die T7-Phagen RNA-Polymerase⁶. Der Start der Transkription der chromosomal kodierten T7-Polymerase wird über den *lac*-Promotor gesteuert, welcher durch die Anlagerung des *LacI*-Repressors inhibiert wird und dadurch eine Transkription der plasmidkodierten *downstream* Gene vom T7-Promotor verhindert⁹⁰. Der Repressor wiederum kann über die Bindung von Gal- β -1,6-Glc-Strukturen eine konformationelle Änderung erfahren und sich vom Operator lösen wodurch die T7-Polymerase mit der Transkription des Zielgens beginnen kann. Zusätzlich kann ein N- oder C-terminaler hexa-Histidin-Tag zum Zielprotein hinzugefügt werden. Die für das Zielprotein kodierende Gensequenz wird über die Schnittstellen der Restriktionsenzyme innerhalb der *Multiple Cloning Site* (MCS) in den pET28aVektor gebracht.

2.8.2 pMK/pMA-Vektoren (*Life Technologies*)

Die Herstellung von synthetischen Genen (*ThermoFisher-Scientific*) erfolgte durch das Zusammenfügen von Oligonukleotiden sowie PCR-Produkten mit anschließender Ligation über *SfiI* in die pMK-beziehungsweise pMA-Lagervektoren. Hierbei verfügt der pMK-Vektor über eine Kanamycin- und der pMA-Vektor über eine Ampicillin-Resistenz. Der 2320 bp große pMX-Vektortyp trägt keine MCS, sodass bei der Planung der synthetischen Gene, die notwendigen Restriktionsschnittstellen für die Umklonierung in das pET-System, auf Genebene mit eingefügt werden müssen.

2.8.3 Eingesetzte Plasmide zur Expression in *E. coli*

Die innerhalb dieser Arbeit eingesetzten Vektoren zur heterologen Proteinproduktion in *E. coli* sind nachfolgend gelistet. Sofern nicht anders angegeben wurden Restriktionsschnittstellen verwendet, die die Kodierung eines N-Terminalen His-*tag* fusionierten Genprodukts erlauben.

Bezeichnung	Domänengrenzen	Uniprot-ID	Quelle
pET28a- <i>Af</i> Sun1C	<i>Af</i> Sun1(149-414)	Afu7g05450	
pET28a- <i>Ca</i> Sun41	<i>Ca</i> Sun41(24-418)	Q59NP5	
pET28a- <i>Ca</i> Sun41C	<i>Ca</i> Sun41(134-418)	Q59NP5	87
pET28a- <i>Cg</i> Sun41C	<i>Cg</i> Sun41(155-427)	Q6FNQ3	87
pET28a- <i>Mo</i> SunC	<i>Mo</i> Sun(92-405)	G4MVC2	
pET28a- <i>Sc</i> Sun4	<i>Sc</i> Sun4(23-420)	P53616	
pET28a- <i>Sc</i> Sun4C	<i>Sc</i> Sun4(147-420)	P53616	87,89
pET28a- <i>Sc</i> Sun4C ^{R276L}	<i>Sc</i> Sun4(147-420)-R276L		
pET28a- <i>Sc</i> Sun4C ^{E283A}	<i>Sc</i> Sun4(147-420)-E283A		
pET28a- <i>Sc</i> Sun4C ^{Q318A}	<i>Sc</i> Sun4(147-420)-Q318A		
pET28a- <i>Sc</i> Sun4C ^{Q318W}	<i>Sc</i> Sun4(147-420)-Q318W		
pET28a- <i>Sc</i> Sun4C ^{Q318C}	<i>Sc</i> Sun4(147-420)-Q318C		
pET28a- <i>Sc</i> Sun4C ^{Q292C}	<i>Sc</i> Sun4(147-420)-Q292C		
pET28a- <i>Sc</i> Sun4C ^{Q304A}	<i>Sc</i> Sun4(147-420)-Q304A		
pET28a- <i>Sc</i> Sun4C ^{N343L}	<i>Sc</i> Sun4(147-420)-N343L		
pET28a- <i>Sc</i> Sun4C ^{N365L,N367L}	<i>Sc</i> Sun4(147-420)-N365L,N367L		
pET28a- <i>Sc</i> Sun4C ^{R232L,D230L}	<i>Sc</i> Sun4(147-420)-N232L,D230L		
pET28a- <i>Ca</i> Pga7	<i>Ca</i> Pga7(18-172)	Q59UT5	
pET28a- <i>Ca</i> Rbt5	<i>Ca</i> Rbt5(23-219)	Q59UT4	
pET28a- <i>Ct</i> Mad1C	<i>Ct</i> Mad1(391-453)	G0S002	
pET28a- <i>Ct</i> Pth11	<i>Ct</i> Pth11(36-101)	G0SBE2	
pET28a- <i>Mg</i> Pth11	<i>Mg</i> Pth11(31-100)	Q9Y786	
pET28a- <i>Pp</i> Ccw14	<i>Pp</i> Ccw14(22-96)	C4QYN8	88
pET28a- <i>Sc</i> Ccw14	<i>Sc</i> Ccw14(19-82)	O13547	88
pET28a- <i>Sc</i> Wsc1	<i>Sc</i> Wsc1(32-118)	P54867	
pET28a- <i>Sc</i> Wsc2	<i>Sc</i> Wsc1(34-118)	P53832	
pET28a- <i>Hs</i> Wscd1	<i>Hs</i> Wscd1(107-201)	Q658N2	

2.9 Verwendete Bakterienstämme

2.9.1 *E. coli* DH5α

Dieser *E. coli* K12 Stamm (*ThermoFisher*) wird bevorzugt zur Plasmidvermehrung herangezogen, da er über eine hohe Plasmidreplikationsrate verfügt. Eine Degradierung plasmidischer DNA durch Endonukleasen, beziehungsweise deren Rekombination wird unter anderem über die Mutationen *endA1*, *hsdR17* und *recA* vermieden⁹. Von diesem Stamm sind chemisch kompetente Zellen in dieser Arbeit verwendet worden.

Genotyp: F' ϕ 80*lacZ*ΔM15 Δ(*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17* (*r_k*⁻, *m_k*⁺) *phoA supE44 λ-thi-1 gyrA96 relA1*

2.9.2 *E. coli* SHuffle T7 Express

Der *E. coli* Shuffle T7 Express Stamm (*New England Biolabs*) wird überwiegend für die heterologe Expression von rekombinanten Proteinen verwendet, bei denen eine Disulfidbindungen strukturell essentiell sein könnte. Durch Deletionen der Gene *gor* und *trxB*, die für Reduktasen kodieren, wird das für Disulfidbrücken erforderliche oxidative Milieu innerhalb des Zytosols erreicht⁹¹. Darüber hinaus verfügt dieser Organismus über eine Disulfidbrückenisomerase (*DsbC*), wodurch falsch geknüpfte Disulfidbindungen neu rearrangiert werden können⁹².

Genotyp: F' *lac, pro, lacI^Q* / Δ(*ara-leu*)7697 *araD139 fhuA2 lacZ::T7 gene1* Δ(*phoA*)*PvuII phoR* *ahpC* galE (or U) galK λatt::pNEB3-r1-cDsbC* (Spec^R, *lacI^q*) Δ*trxB rpsL150*(Str^R) Δ*gor* Δ(*malF*)3

3 Methoden

Das methodische Repertoire, das zur Erarbeitung dieser Dissertation notwendig war, setzt sich aus vielen wohletablierten, oft zitierten Methoden, unterschiedlicher wissenschaftlicher Kompetenzen zusammen. In diesem Teil soll daher nur auf relevante Methoden näher eingegangen werden.

3.1 Bioinformatische Methoden

Die stetig wachsende Anzahl an wissenschaftlichen Erkenntnissen sorgt für eine Unmenge an Informationen, die wiederum biologische Datenbanken kontinuierlich füllen. Der Umgang mit diesen bioinformatischen Datenmengen, die Informationen auf Gen-, Protein-, Struktur- oder Funktions-Ebene liefern, findet sich sowohl in der Projektplanung als auch bei der Evaluierung von Resultaten wieder und ist somit ein wichtiger Bestandteil dieser Arbeit.

3.1.1 Phylogenetische Analyse

Evolutionäre Veränderungen sorgen stetig für stille Mutationen auf DNA-Ebene. Daher ist die bioinformatische Suche auf DNA-Ebene nur zwischen nahe verwandten Organismen (Taxa) möglich. Anders ist es auf Aminosäureebene, da direkte Veränderungen einzelner Aminosäuren mit dem sofortigen Funktionsverlust einhergehen können und daher durch den Selektionsdruck weitgehend vermieden werden. Als Folge dessen sind bioinformatische Analysen auf Proteinsequenzebene oder auf Proteinstrukturebene eine gute Möglichkeit, Ähnlichkeiten von entfernten Verwandten zu untersuchen.

Für phylogenetische Analysen wurde auf die hinterlegten Proteinfamilien mit den dazugehörigen Sequenzen der folgenden Datenbanken zurückgegriffen und mit einem multiplen Sequenzalignment (MSA) mittels *TCoffee*^{93,94} begonnen.

	Pfam	InterPro
SUN	PF03856	IPR005556
CFEM	PF05730	IPR008427
WSC	PF01822	IPR002889

Sofern zusätzlich strukturelle Informationen vorhanden sind, können diese mit in das Sequenzalignment einfließen. Ermöglicht wird dies durch die *TCoffee* variante *Espresso*⁹⁵

Das berechnete MSA wird dann für die Ermittlung eines phylogenetischen Baumes in das Programm MEGA6⁹⁶ eingelesen und danach eine phylogenetische Rekonstruktion nach der *maximum-likelihood* Methode durchgeführt. Hierbei wird als Substitutionsmodel für Aminosäuren die WAG-Matrix

(*Whelan and Goldman Matrix*)⁹⁷ herangezogen, da diese besonders effizient den evolutionären Prozess von globulären Proteinen berücksichtigt⁹⁸. Zusätzlich werden Lücken in der Sequenz vereinzelt reduziert und der geringste Abstand der einzelnen Äste zueinander mittels *nearest-neighbor-interchange* (NNI) Methode berechnet. Abschließend wird ein phylogenetischer Baum anhand der *neighbor-joining* Methode erstellt. Dieses vorläufige Resultat kann dann im Anschluss, mithilfe von *Fig-Tree* 1.4⁹⁹, grafisch aufgearbeitet werden.

3.1.2 Enzym-Funktions-Netzwerke (EFI-EST)

Der exponentielle Anstieg an biologischen Daten innerhalb der letzten Jahrzehnte, bedarf einer neuartigen Visualisierungsplattform. Hierbei müssen unterschiedliche Informationsbereiche miteinander verknüpft werden. Ein erster Schritt der Verknüpfung von Sequenz-, Struktur- und Funktionsdaten versucht die *Enzyme Function Initiative* (EFI) des *National Institute of General Medical Sciences* (NIH) mit dem EFI-EST(*Enzyme Similarity Tool*) *web server*. Sequenzähnlichkeits-Netzwerke (*Sequence Similarity Networks*, SSNs) sind ein hilfreiches Instrument um Sequenzbeziehungen auch innerhalb einer großen Gruppe von Proteinen visualisieren zu können. Hiermit können sogar gesamte (Super)-Proteinfamilien mit weit über 100.000 Sequenzen gegeneinander, im Sequenzraum, dargestellt werden und diese anhand von zusätzlichen Informationsbereichen weiter kategorisiert werden¹⁰⁰.

Ein Beispiel eines einfachen SSN, wie in folgender Abbildung gezeigt, in dem jeder Knotenpunkt für eine Proteinsequenz und die Position, entsprechend dem gewählten *E-value*, für deren Verwandtschaft untereinander steht. Hierfür wird das ausgewählte Set, bestehend aus Proteinsequenzen mit Hilfe einer BLAST (*all-vs-all*) Gegenüberstellung untereinander verglichen und mit den daraus resultierenden Paarvergleichswerten (*E-value*) determiniert, welche Proteinsequenzen innerhalb des Netzwerkes miteinander in Kontakt stehen sollen oder nicht.

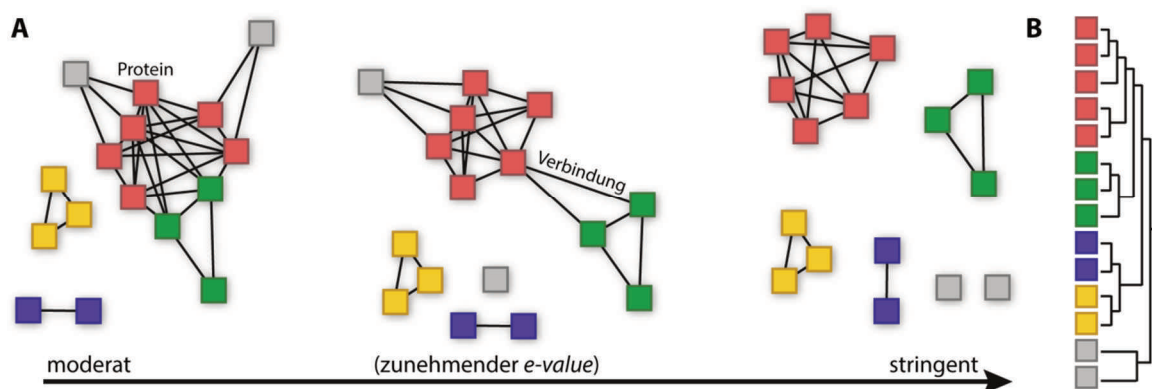


Abbildung 15 – A) Beispiel eines *sequence similarity network* (SSN) und dessen Topologieänderung mit steigenden *E-values*. B) Ein simuliertes Dendrogramm für die Sequenzen des SSN anhand des Beispielmmodels.

Hierbei werden die Proteinsequenzen miteinander gepaart, deren Wert über der Obergrenze des gesetzten *alignment-score* liegt. Bei zwei Proteinen, die nicht miteinander verbunden sind, liegt deren Wert folglich unterhalb der gewählten Obergrenze. Die Generierung der EFI-EST Datensätze erfolgte mit den Standardeinstellungen ($E\text{-value} = 10^{-5}$) ohne Datenreduktion ($Fraction = 1$). Sofern das SSN nur für die jeweilige Domäne und nicht das volllängen Protein durchgeführt werden soll, kann dies mit der Option ausgewählt (Domain = ON) werden. Die Visualisierung der generierten Daten erfolgt mit Hilfe von *Cytoscape* 3.4.0¹⁰¹. *Cytoscape* ermöglicht die Evaluierung durch Visualisierung der molekularen Interaktionsnetzwerke, von biologischen Systemen und deren Annotation durch Zusatzinformationen, wie vorhanden Proteinstrukturen oder Aktivitätseinteilungen.

3.1.3 Molekulardynamische Simulationen

Computersimulationen erweitern die traditionellen Methoden der Strukturaufklärung, bestehend aus dem experimentellen Versuch und der daraus resultierenden Theorie, und sorgen somit für ein tieferes Theorieverständnis im Allgemeinen. Hierbei haben molekulardynamische Simulationen von Biomolekülen einen hohen Stellenwert, da diese Technik die Gleichgewichts- und Transporteigenschaften anhand von klassischen Mehrkörpersystemen berechnen kann. Molekulardynamische Simulationen (MD-Simulationen) veranschaulichen zeitaufgelöst das Verhalten von biologischen Makromolekülen in voller atomarer Auflösung und erlauben daher Rückschlüsse auf Proteinfaltung, Ligandbindung, Transportprozesse, sowie konformationelle Strukturänderungen und der damit einhergehenden Proteinfunktionalität¹⁰².

MD-Simulationen entsprechen in ihrer Durchführung realen *in silico* Experimenten, da auch hier die simulierte Probe vorbereitet werden muss. Hierfür wird das Programm AMBER14¹⁰³ (eng. *Assisted Model Building and Energy Refinement*) verwendet. Zusätzlich muss ein geeignetes Kraftfeld, das die Energie- beziehungsweise Potentialfunktion V , die die Wechselwirkungen der Atome untereinander beschreibt und von der Atomposition \vec{r}_i abhängig ist, gewählt werden. Die Potentialfunktion setzt sich dabei aus den Termen der bindenden $V_b(\vec{r}_i)$ sowie der nicht-bindenden $V_{nb}(\vec{r}_i)$ Wechselwirkungen zusammen.

$$V(\vec{r}_i) = V_b(\vec{r}_i) + V_{nb}(\vec{r}_i)$$

Bindende Wechselwirkungen, beschrieben durch harmonische Potentiale, sind kovalente Bindungen, die eine energetische Dynamik in Bezug auf Bindungslänge, Bindungswinkel sowie Torsion (Abbildung 16) aufweisen.

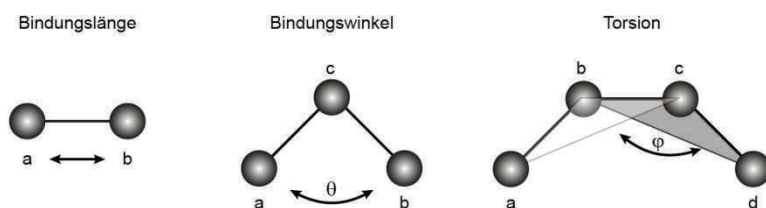


Abbildung 16: Streck-, Biegeschwingungen sowie Torsionsschwingungen von kovalenten Bindungen.

Unter nichtbindende Wechselwirkungen fallen Interaktionen, die sich über Coulomb-Kräfte (Ionenbindung) und Van-der-Waals-Kräfte (Interaktion elektrisch neutraler Atome) ausbilden.

Die Berechnung der auftretenden Wechselwirkungen innerhalb einer MD-Simulation benötigt aufgrund der Potentialfunktion eine große Anzahl an bekannten Parametern. Da die Potentialfunktion jedoch selbst eine vereinfachte Darstellung ist (u.a. fehlende Polarisierbarkeit), werden sogenannte Kraftfelder (*engl. force fields*) herangezogen, bei denen die Parameter mit experimentellen Daten auf empirischem Wege an die jeweiligen Modelle angepasst werden¹⁰².

In dieser Arbeit wurde das Amber *force-field* 99SB¹⁰³ für den Proteinanteil sowie das GLYCAM06¹⁰⁴ *force-field* für den Glykoproteinteil herangezogen.

Um MD-Simulationen mittels AMBER14 durchzuführen, werden folgende Dateitypen benötigt:

prmtop Parameter und Topologie der Moleküle innerhalb des verwendeten Systems.

inpcrd Beinhaltet die Anfangskoordinaten der Moleküle im System.

mdin Trägt die Einstellungen für den jeweiligen MD-Lauf.

Begonnen wird mit der Energieminimierung (2 ns) des Systems bei 0 K und dem damit einhergehenden Auflösen von Kontaktstellen, die sich innerhalb des Proteinkristalls ausgebildet haben. Die Größe der hier verwendeten Box beträgt 86 x 75 x 91 Å. Im Anschluss daran knüpft sich die Equilibrierungsphase, in der das System unter Berücksichtigung des Kanonischen Ensembles (NVT) wieder auf 300 K erwärmt bis sich ein thermisches Gleichgewicht eingestellt hat. Darauf aufbauend erfolgt die eigentliche MD-Simulation in 2 fs Schritten bei 300K, 1bar (NPT) für 100ns.

Die Visualisierung und damit einhergehende Auswertung der erhaltenen Trajektorien erfolgt mittels VMD1.9.2 (*VisualMolecularDynamics*)¹⁰⁵.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die von K.B. MULLIS *et al.* im Jahre 1985 entwickelte Polymerasenkettenreaktion (*eng. Polymerase-Chain-Reaction, PCR*), stellt die Grundlage für das moderne molekularbiologische Arbeiten dar. Hierbei werden DNA-Segmente über einen zyklischen Verlauf exponentiell vervielfältigt¹⁰⁶. Dieser Verlauf beginnt mit dem Schmelzen der doppelsträngigen DNA, sowie einer anschließenden Primeranlagerung. Die künstlich synthetisierten DNA-Primer binden an die komplementäre Sequenz der Einzelstrang-DNA und ermöglichen der Phusion-Polymerase die Elongation des DNA-Strangs.

	Volumen	Endkonzentration	
Templat-DNA	1 µL		
dNTPs (10 mM)	1 µL	0.2 mM	
Primer Fwd. (10 µM)	1.25 µL	250 nM	
Primer Rev. (10 µM)	1.25 µL	250 nM	
Phusion HF-Puffer 5x	10 µL	1 x	
Phusion-Polymerase (2U/µL)	0.5 µL	0.02 U/µL	
bidest. H ₂ O	Ad 50 µL		

	Temperatur	Zeit	
Initiale Denaturierung	98 °C	5 min	
Annealing	± 3°C (Primer-T _m)	30 s/bp	5 x
Elongation	72 °C	5 min	
Denaturierung	98 °C	5 min	25 x
Annealing	± 3°C (Primer-T _m)	5 min	
Elongation	72 °C	30 s/bp	
Abschließende Elongation	72 °C	7 min	
hold	4 °C	∞	

3.2.2 PCR-Aufreinigung

Um nach der PCR überschüssige Nukleotide, Primer, Enzyme oder Salze zu entfernen, erfolgt die Aufreinigung des vervielfältigten Fragments mittels des QIAquick PCR Purification Kits (*Qiagen*). Die DNA wird hierbei auf der Silicamatrix adsorbiert, Verunreinigungen durch Waschen mittels eines ethanolhaltigen Puffer (PE) entfernt und abschließend die DNA mithilfe eines Niedrigsalzpuffers (EB) eluiert.

Zum PCR-Ansatz wird das fünffache Volumen PB-Puffer hinzugegeben und auf eine QIAquick-spin Säule aufgetragen. Danach wird zentrifugiert (17900 x g, 60 s, RT), wobei der Durchfluss verworfen wird. Zum Waschen werden 750 µL PE-Puffer hinzugegeben und erneut zentrifugiert (17900 x g 60 s, RT). Nach dem Verwerfen des Durchflusses erfolgt ein erneuter Zentrifugations-

schritt mit anschließendem Trocknen der Säule (5 min). 30 – 50 µL EB-Puffer (45 °C) werden mittig auf die Silicamatrix gegeben und nach einminütiger Inkubation bei Raumtemperatur das PCR-Amplifikat mittels Zentrifugation (17000 x g, 60 s) eluiert.

3.2.3 DNA-Restriktionsverdau

Restriktionsenzyme sind in der Lage spezielle, meist palindromische Basensequenzen zu erkennen und diese katalytisch zu spalten. Dabei kann je nach Enzym ein glatter (*eng. blunt-ends*) oder asymmetrischer Schnitt (*eng. sticky-ends*) innerhalb der DNA erfolgen¹⁰⁷. Der präparative Restriktionsverdau erfolgt für 4 h bei 37 °C. Der analytische Verdau (5 µL Templat-DNA) erfolgt für 2 h bei 37 °C. Das Enzym wird anschließend bei 65 °C für 20 min hitzeinaktiviert. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes ist in folgender Tabelle beschrieben.

	Volumen
DNA	5-50 µL
Restriktionsenzym	0.5 µL - 2 µL
Puffer 100x	1x
Bidest. H ₂ O	ad min 10 µL

3.2.4 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ist eine Schlüssel-Methode zur Aufreinigung und Trennung von DNA-Fragmenten in der Nukleinsäure-Analytik. Die Auftrennung der negativ geladenen DNA-Fragmente erfolgt über deren unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit innerhalb des Agarosegels bei konstanter Spannung. Hierbei verfügen kleinere Fragmente im Vergleich zu großen über eine höhere Mobilität, sodass diese schneller zur Anode wandern, und eine größenspezifische Auftrennung entsteht. Verunreinigungen wie einzelne Nukleotide, Primer oder Salze werden auf diese Weise abgetrennt. Durch einen ebenfalls aufgetragenen DNA-Marker, der DNA-Fragmente bekannter Größen enthält, ist außerdem eine Größenabschätzung der aufgetrennten Fragmente möglich. Für die Gelelektrophorese wird ein 1 % Gel, bestehend aus 1 g Agarose in 100 mL TBE-Puffer (0.1 M Tris, 0.1 M Borsäure, 2 mM EDTA) durch Erhitzen gelöst. Bis zum Abkühlen des Gels auf ca. 55 °C wird die Lösung im Wasserbad gerührt und 3 µL MIDORI Green zu 50 mL Agarosegel hinzugegeben¹⁰⁸. Die Spannung wird für 1 h auf 120 V eingestellt.

3.2.5 Gelextraktion von DNA-Fragmenten

Eine präparative Agarosegelelektrophorese kann dafür eingesetzt werden um gezielt DNA-Fragmente zu extrahieren. In dieser Arbeit ist das QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) verwendet worden. Die gewünschte Bande wird bei UV-Bestrahlung mit einem Skalpell vorsichtig herausgeschnitten, pro 100 mg Gelfragment 300 µL QG-Puffer hinzugegeben. Nach vollständigem Lösen bei 50 °C im

Thermoschüttler werden 100 µL Isopropanol hinzugefügt, die Lösung invertiert und auf eine QIAquick spin column aufgetragen. Nach einer Zentrifugation (17900 x g, 1 min, RT) wird der Durchfluss verworfen, 750 µL PE-Puffer werden hinzugegeben und erneut zentrifugiert (17900 x g, 1 min, RT). Nach dem Verwerfen des Durchflusses zentrifugiert man erneut. Die Säule wird in ein 1.5 mL Eppendorf-Cup gestellt und 5 min offen stehen gelassen um überschüssiges Ethanol zu entfernen. Abschließend werden 30-50 µL an vorgewärmten EB-Puffer (45 °C) zum Eluieren auf die Silicamatrix gegeben und nach einminütiger Inkubation zentrifugiert (17900 x g, 1 min, RT).

3.2.6 Ligation

Unter einer Ligation versteht man die enzymatische Verknüpfung von linearisierten DNA-Segmenten. Die Ligation schließt sich in der Regel an den Restriktionsverdau an. In dieser Arbeit wird vorrangig die T4- DNA-Ligase verwendet. Die Ligation erfolgt entweder bei 37 °C für 4 h oder bei 16 °C über Nacht.

3.2.7 Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Der benötigte *E. coli* Stamm wird von einer Glycerin-Lagerkultur auf einer LB-Agarplatte mit dazugehörigem Selektionsmarker ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Hiervon werden zwei 5 mL LB-Medium inokuliert und bei 37 °C, 225 rpm über Nacht inkubiert. Anschließend wird zweimal 50 mL LB-Medium im Verhältnis 1:100 inokuliert und die Zellen bis zu einer OD₆₀₀=0.5-0.6 bei 37 °C, 225 rpm vermehrt. In dieser exponentiellen Phase erfolgt das Pelletieren der Zellen (3200 x g, 15 min, 4°C). Nach dem Verwerfen des zellfreien Überstandes wird das Zellpellet in 15 mL TFB I-Puffer resuspendiert und für zwei Stunden auf Eis inkubiert. Im Anschluss daran werden die Zellen erneut pelletiert (3200 x g, 15 min, 4°C) und nach dem Verwerfen des Überstandes die Zellen in 2 mL TFB II-Puffer resuspendiert¹⁰⁹. Abschließend werden je 50 µL, an kompetenten Zellen, in sterile 1.5 mL Reaktionsgefäße aliquotiert und in flüssigem Stickstoff weggefroren. Die Lagerung erfolgt bei -80 °C.

TFBI-Puffer	Konzentration	für 50 mL	TFBII-Puffer	Konzentration	für 10 mL
RbCl	100 mM	0.605 g	RbCl	10 mM	0.012 g
MnCl ₂	50 mM	0.405 g	MOPS	10 mM	0.209 g
Kaliumacetat	30 mM	0.147 g	CaCl ₂ Dihydrat	75 mM	0.107 g
CaCl ₂ Dihydrat	10 mM	0.071 g	Glycerin (87 %)	15 % (v/v)	1.72 mL
Glycerin (87 %)	15 % (v/v)	8.62 mL			

3.2.8 Transformation chemisch kompetenter Zellen

Bei einer erfolgreichen Ligation bilden Insert und Vektor ein stabiles zirkuläres Plasmid, das mittels Hitzeschocktransformation in bakterielle Systeme eingebracht werden kann. Die hierbei verwendeten chemisch kompetenten Zellen verfügen über eine destabilisierte Plasmamembran, wobei Calcium-Ionen die Permeabilität der Membran für DNA positiv beeinflussen^{109,110}.

Vom Ligationsansatz werden 5 µL Plasmid zu einem 50 µL Aliquot chemisch kompetenter DH5α gegeben und für ca. 10 min auf Eis inkubiert. Bei Retransformationen sind in der Regel bereits 0.2 µL (50 ng) Plasmid-DNA ausreichend. Danach werden die Zellen für 1 min in einen 42 °C Heizblock erhitzt und auf Eis mit 950 µL LB-Medium versetzt. Anschließend werden die Zellen zur Inkubation für 1 h bei 37 °C in den Thermoschüttler (225 rpm) gestellt. Nach einem Zentrifugationsschritt (15000 x g, 1 min, RT) werden 950 µL vom Überstand entfernt und das Pellet in der restlichen Flüssigkeit resuspendiert und anschließend auf LB-Agar-Platten mit Kan³⁵-Selektionsmarker aufgetragen. Bei einer Retransformation werden nur 100 µL ausplattiert. Die Inkubation erfolgt über Nacht im Brutschrank bei 37 °C.

3.2.9 Übernachtskulturen (ÜNK)

Zur Herstellung von Übernachtskulturen werden jeweils 5 mL LB-Medium mit 5 µL Kan³⁵ in sterile Kulturröhrchen gegeben. Im Anschluss daran werden einzelne Kolonien von einer LB-Agar-Platte in das Medium eingebracht. Die Inkubation der Kulturen erfolgt über Nacht im Thermoschüttler (37 °C, 225 rpm).

3.2.10 Plasmid-Präparation

Die Plasmid-Präparation ist eine grundlegende Methode in der Molekularbiologie um Plasmid-DNA zu isolieren. Nach alkalischer Zelllyse und Abtrennung von Verunreinigungen wie der genomischen DNA kann die Plasmid-DNA mittels Isopropanolfällung abschließend erhalten werden¹¹¹. Jeweils 2x2 mL der Übernachtskulturen werden pelletiert (13000 rpm, 5min, RT). Nach dem Verwerfen des Überstandes wird das Pellet mit 300 µL P1-Puffer resuspendiert. Danach werden 300 µL P2 und nach kurzem Invertieren 300 µL P3 hinzugegeben. Die Reaktionsgefäße werden 10 min auf Eis inkubiert und anschließend zentrifugiert (13000 rpm, 30 min, 4°C). Das Pellet wird verworfen und zum Überstand 600 µL Isopropanol hinzugegeben, was ein Fällern der plasmidischen DNA bewirkt. Im Folgenden wird die Suspension stark durchmengt und nach einem weiterem Zentrifugationsschritt (13.000 rpm, 30 min, 4 °C) der Überstand verworfen. Das Pellet wird mit 100 µL EtOH (70%) gewaschen, im Anschluss zentrifugiert man erneut (13.000 rpm, 1 min, RT) und verwirft den etha-

nolhaltigen Überstand. Das Pellet wird ca. 30 min bei 37 °C im Heizblock getrocknet und in 30 µL EB-Puffer gelöst.

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 Testexpressionen

Da auf bioinformatischer Grundlage Domänengrenzen festgelegt wurden, für die es bisher keine Informationen zu Ausbeuten und Löslichkeit einer heterologen Expression in *E. coli* vorhanden sind, erfolgte die Proteinproduktion von rekombinanten Proteinen zuerst im analytischen Maßstab. Dafür wurden relevante Expressionsparameter wie Temperatur (12 °C, 20 °C und 37 °C), Dauer (24 h, 46 h und 72 h) sowie Induktionsart (auto, IPTG 0.05 mM - 0.5 mM) variiert⁸⁸.

Zu jeweils 50 mL Medium werden 50 µL Kan³⁵ (1:1000) Selektionsmarker hinzugegeben. Anschließend wird mit 1 mL ÜNK (1:50) inokuliert. Bei einer Autoinduktion werden die Kulturen bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0.6 - 0.7 wachsen gelassen und anschließend auf die Expressionstemperatur heruntergekühlt. Bei einer IPTG-Induktion lässt man die Kulturen bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0.3 - 0.4 anwachsen, bringt diese auf ihre letztendliche Expressionstemperatur und induziert die Expression mittels IPTG-Zugabe bei einer optischen Dichte zwischen 0.5 - 0.6. Zur Zellernte werden die Kulturen in 50 mL Polypropylenröhrchen gegeben und pelletiert (20 min, 3200 x g, 4°C). Nach dem Verwerfen des Überstandes werden die Zellen in 1 mL AM-Puffer auf Eis resuspendiert.

3.3.2 Analytischer Zellaufschluss

Um Testexpressionen in Bezug auf eine Proteinüberproduktion und Proteinlöslichkeit auswerten zu können, folgt auf den analytischen Zellaufschluss die SDS-PAGE. Der Überstand und das Pellet werden untersucht und das Verhältnis von Protein in der löslichen Fraktion gegenüber der unlöslichen Fraktion bestimmt.

Dafür werden zu 1 mL resuspendiertem Zellpellet 1 µL Lysozym (50 mg/mL), 1 µL EDTA (0.1 M), 1 µL PMSF (0.2 M) hinzugegeben und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Lysozym destabilisiert durch die Spaltung von Peptidoglycan die Bakterienzellwand¹¹², EDTA inhibiert Metalloproteasen durch die Komplexbildung von Metallkationen²⁷ und PMSF inhibiert Serin-Proteasen durch irreversible Bindung an das Serin innerhalb des aktiven Zentrums¹¹³. Daran knüpft sich der Zellaufschluss mittels FastPrepTM-24 (6.5 m/s, 4x30 s) mit abschließendem Zentrifugationsschritt (17900 x g, 15 min, 4 °C). Der Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß gegeben und das Pellet in 1 mL AM-Puffer resuspendiert.

3.3.3 Präparative heterologe Expression

In dieser Arbeit wurde die präparative heterologe Expression rekombinanter pilzlicher Zellwandproteine, sowie deren Varianten im *E. coli* SHuffle T7 Express Stamm durchgeführt. Dafür werden 6x50 mL LB-Medium (Kan³⁵) durch vorher hergestellte Glycerinkulturen aus der eigenen Stammsammlung inokuliert und über Nacht herangezogen (225 rpm, 37 °C). Jeweils 40 mL der Vorkultur werden in 2 L warmes LB-Medium (Kan³⁵) gegeben und bis zu einer OD₆₀₀ von 0.2 - 0.3 wachsen gelassen (120 rpm, 37 °C). Danach werden die Kolben auf die Expressionstemperatur von 12 °C gebracht und bei einer optischen Dichte zwischen 0.5 - 0.6 durch IPTG-Zugabe (0.05 - 0.5 mM) die Expression gestartet. Nach 72 h (120 rpm, 12 °C) erfolgt die Zellernte. Die Zellen werden dabei in JA-10 Zentrifugenbechern pelletiert (7.000 rpm, 15 min, 4 °C). Das Pellet wird im Anschluss daran in 25 mL AM-Puffer resuspendiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgt bei -80 °C.

3.3.4 Präparativer Zellaufschluss

Der präparative Zellaufschluss erfolgt mittels FastPrepTM-24. Hier werden Glasperlen durch stark oszillierenden Bewegungen im 50 ml Polypropylen Röhrchen beschleunigt, wodurch die zugegebene Zellmasse mechanisch aufgeschlossen wird. Für einen möglichst optimalen Zellaufschluss muss das Verhältnis Glasperlen zu Zellen und zur verbleibenden Luft innerhalb des Reaktionsröhrchens im Idealfall 1:3.5:0.5 betragen.

Ein 50 mL Polypropylenröhrchen wird mit ca. 10 mL Glasperlen (0.2 - 0.3 mm) vorbereitet. Dazu werden bis zu 40 mL resuspendiertes Zellpellet hinzugegeben und mit 20 µL Lysozym (50 mg/mL), 20 µL EDTA (0.1 M), 5 µL PMSF (0.2 M) sowie einer Spatelspitze DNase versetzt. Nach 10 minütiger Inkubation auf Eis wird der Deckel des Röhrchens zusätzlich mit Parafilm abgedichtet. Der Zellaufschluss erfolgt bei 3x60 s und einer Beschleunigungsgeschwindigkeit von 6.5 m/s. Zwischen den 60 s Schritten werden die Proben 2 min in Eiswasser gekühlt. War nach dem Aufschluss die Schaumbildung zu stark, so wurde ein kurzer Zentrifugationsschritt (3200 x g, 4°C, 1 min) durchgeführt. Danach wird der Überstand in JA-20 Zentrifugenbecher gegeben und die unlöslichen Bestandteile pelletiert (18.000 rpm, 4 °C, 60 min). Der verbleibende Überstand wird über einen Spritzenfilter (0.2 µm) filtriert und kann danach auf eine Ni-NTA-Säule aufgetragen werden.

3.4 Proteinaufreinigung

Nach der heterologen Expression und dem Aufschluss der Zellen erhält man in der löslichen Fraktion ein Proteingemisch bestehend aus anderen zytosolischen *E. coli* Proteinen sowie dem rekombinanten Protein von Interesse. Die Isolation der unterschiedlichen Proteine erfolgt im Anschluss anhand deren physikalischer Eigenschaften über chromatografische Systeme.

3.4.1 Ni-NTA-Affinitätschromatografie

Dieses Aufreinigungsverfahren beruht auf der spezifischen Protein-Ligand-Interaktion zwischen Nitrilotriessigsäure (NTA)-Einheiten, die an einer quervernetzten Agarosematrix immobilisiert vorliegen und der Chelatisierungsreaktion von Ni^{2+} -Ionen durch benachbarte Histidin-Seitenketten, sodass hierüber Fusionsproteine über ihren His-tag an das Säulenmaterial gebunden werden¹¹⁴. Über einen Waschschrift werden alle ungebundenen Bestandteile abgetrennt und danach das rekombinante Protein über eine Verdrängungsreaktion durch Imidazol, einem Strukturanalogen von Histidin, von der stationären Phase eluiert¹¹⁴.

Die unter 20 % Ethanol gelagerte 5 mL Protino® Ni-NTA Säule (*Macherey-Nagel*) wird mit 10 Säulenvolumen (CV) dH_2O gewaschen und mit 10 CV AM-Puffer äquilibriert. Sterilfiltriertes Protein wird hiernach über eine Probenpumpe des *Biorad* NGC-Systems (100 mL, 1 mL/min, *inlet sample pump*) auf die Säule aufgetragen und der Durchfluss im Ausgangsgefäß gesammelt (*outlet valve, port 2*). Anschließend wird die Säule erneut mit 4 CV AM-Puffer gewaschen und unspezifisch gebundene Proteine dann mit 5 % Imidazol (25 mM) von der Säule gelöst. Die Elution erfolgt über einen Imidazolstufengradienten (300 mM und 500 mM), wobei ab einer Obergrenze von 50 mAU bei 280 nm automatisch in 1 mL Fraktionen gesammelt wird. Abschließend wird die Ni-NTA Säule mit jeweils 10 CV dH_2O und Ethanol (20 %) gewaschen und im Kühlraum gelagert.

3.4.2 Gelfiltrationschromatographie

Die gelfiltrationschromatografische Auftrennung beruht auf dem Größenausschlussverfahren von Proteinen und deren Diffusionskoeffizienten innerhalb der stationären Agarose-Dextran Matrix¹¹⁵. Dabei nimmt die Retentionszeit der Proteine, mit zunehmender Größe linear ab, sodass kleinere Partikel längere Verweilzeiten innerhalb der quervernetzten Agarose-Dextran Matrix haben. Für präparative Zwecke wurde eine selbstgepackte Säule (16/60 Superdex 200 pg, 120 mL) verwendet.

Die unter Ethanol gelagerte Säule wird am FPLC-System mit 2 CV H_2O gewaschen und mit 2 CV AM-Puffer äquilibriert. Um eine Peakverbreiterung zu minimieren wird möglichst hochkonzentrierte Proteinlösung über einen 1 mL Loop auf die Säule gegeben und bei einer Flussrate von 1 mL/min

eluiert. Die Fraktionierung erfolgt hierbei automatisiert in 1 mL Fraktionen oberhalb einer Absorption von 50 mAU bei 280 nm.

3.5 Proteinanalytische Methoden

3.5.1 SDS-PAGE Analyse

Die SDS-PAGE ist eine analytische Methode um Proteingemische anhand ihrer apparenten Molekülmasse in einem elektrischen Feld aufzutrennen²⁹. Die diskontinuierliche Gelelektrophorese erreicht aufgrund der isotachophoretischen Fokussierung (Sammelgel) und der anschließenden Größenauftrennung (Trenngel) eine hohe Bandenschärfe. Die Proteinprobe wird nach Zugabe von SDS-Probenpuffer 5 Minuten bei 95 °C denaturiert, wodurch eine Linearisierung bewirkt wird. SDS bindet an das Protein, sodass die negativen Ladungen des Dodecylsulfats die Proteineigenladung maskiert. Die Proben werden in die Probentaschen gegeben und ein elektromagnetisches Feld mit einem Strom von 30-40 mA angelegt, sodass die negativ geladenen Proteine zur Anode wandern. Für eine Größenabschätzung wird ein Proteinmarker mitlaufen gelassen. Abschließend werden die Proteine durch *Coomassie brilliant blue* R-250 über basische Seitengruppen (Arg) sichtbar gemacht.

	Sammelgel	Trenngel
Acrylamidlösung (37.5:1)	6.65 mL	45 mL
Trenngelpuffer	-	25 mL
Sammelgelpuffer	10 mL	-
10 % SDS	500 µL	750 µL
dest. H ₂ O	32.85 mL	4.3 µL
TEMED	50 µL	75 µL
APS	500 µL	375 µL

3.5.2 Western Blot

Der Western Blot ist eine biochemische Analysemethode, mit der Proteine sehr spezifisch über Immunodetektion nachgewiesen werden können¹⁴. Zu Beginn werden Proteinproben mit einer Konzentration von 5-25 ng, in die Taschen des SDS-Polyacrylamidgels gegeben, und danach mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Während dessen werden eine Nitrocellulose-Membran und acht Whatman-Filterpapiere auf die Trenngelgröße zugeschnitten und für 30 min in Blot-Puffer inkubiert. Der Aufbau der Blot-Apparatur setzt sich von der Kathode zur Anode hin betrachtet aus vier Whatman-Filterpapieren, dem SDS-Gel, einer Nitrozellulosemembran und vier weiteren Whatman-

Filterpapieren zusammen. Das Blotten wird mit einer Stromstärke von 62 mA/Gel, bei maximal 5 V für 75 min durchgeführt. Die Membran wird mit einer Tintenlösung angefärbt, die einzelnen Reihen sowie Markerbanden markiert und mit 0.1 M NaOH-Lösung wieder entfärbt. Anschließend wird die Membran in Wasser gespült, ein Mal für 10 min mit TBS-Puffer, zwei Mal für 10 min mit TBST-Lösung gewaschen und über Nacht bei 6 °C in Blocking-Puffer inkubiert. Nach dem Entfernen des Blocking-Puffers wird zwei Mal für 10 min mit TBST-Puffer und ein Mal mit TBS-Puffer gewaschen.

Zu 20 mL Blocking-Puffer werden 6 µL anti-penta-His-HRP-Konjugat im Verhältnis 1:3000 gegeben und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wird die Membran zwei Mal 10 min mit TBST-Puffer und dann 10 min mit TBS-Puffer gewaschen. Um die Chemilumineszenz-Reaktion zu starten, wird 1 mL Luminol/H₂O₂-Lösung auf die Membran gegeben und die Membran für 2 min bei RT inkubiert. Anschließend wird die Membran in eine Dokumentationsstation gelegt und die gebildete Chemilumineszenz über eine CCD-Kamera ausgelesen.

3.5.3 Glycan array screening

Bei dem *glycan array screening* handelt es sich um eine Hochdurchsatz-Methode für die Interaktionsuntersuchung von Glykanen mit biologisch relevanten Strukturen, wie Antikörpern, Proteinen, Viren oder ganzen Zellen¹⁷. In dieser Arbeit erfolgte die Zusammenarbeit mit dem *Consortium for Functional Glycomics* (Atlanta, GA, USA). Verwendet wurde das *mammalian array* (version 5.1) mit 611 unterschiedlichen Kohlenhydratstrukturen. Zum Erstellen eines Micro-Arrays, wie in Abbildung 17 dargestellt, werden verschiedene synthetische sowie natürliche Saccharide über Amino-Linker auf N-Hydroxysuccinimid (NHS)-aktivierte Objektträger kovalent immobilisiert.

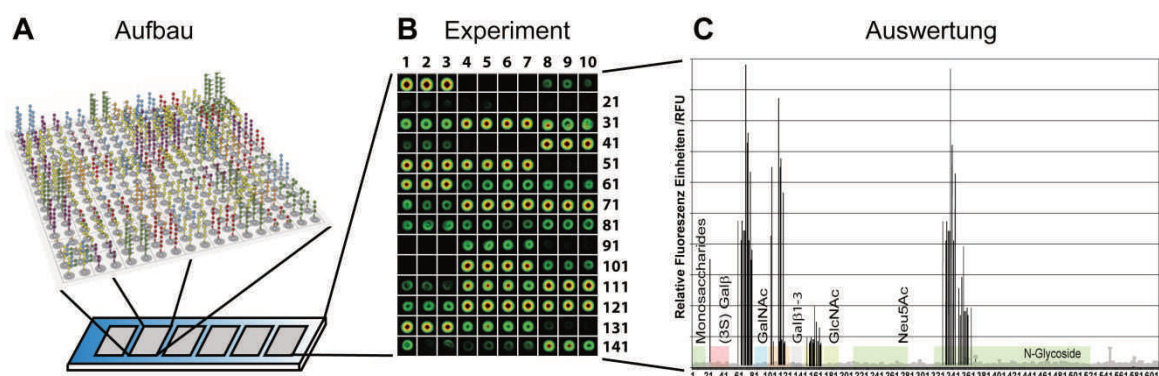


Abbildung 17: A. Schematische Darstellung des Hochdurchsatz *polysaccharid profiling* zeigt den Glasträger, auf dem in mehreren Bereichen unterschiedliche Kohlenhydratstrukturen immobilisiert werden. B. Nach der Zugabe des fluoreszenzmarkierten Proteins sowie eines darauf folgenden Waschschritts wird die verbleibende Fluoreszenz gemessen. C. Das Resultat wird dann in Form eines Balkendiagramms grafisch dargestellt (abgeändert nach RILLAHAN¹¹⁶ und MOLLER *et.al.*¹¹⁷).

Fluoreszenzmarkiertes Protein (200 $\mu\text{g/mL}$) wird über die Zuckerstrukturen gegeben und nach einem Waschschrift, die verbleibende relative Fluoreszenz (*resonance fluorescence units*, RFU) detektiert, so dass jedem Rasterfeld einen Fluoreszenzwert zugewiesen werden kann. Durch die Messung einer Verdünnungsreihe, bei der die Proteinmenge variiert wird, können zudem Aussagen zur ligandenspezifischen Affinität getroffen werden.

Für eine gesicherte statistische Aussage wird jede Probe sechs Mal vermessen, wobei das höchste und niedrigste Resultat nicht in die Auswertung mit einbezogen werden und aus den verbleibenden 4 Messwerten ein Mittelwert samt Standardabweichung ausgegeben wird.

3.5.4 Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC)

Die isothermale Titrationskalorimetrie (ITC) ist eine etablierte Methode, die unter anderem in der pharmazeutischen Chemie für das Drug Design nicht mehr wegzudenken ist¹¹⁸. Hierbei erfolgt die Untersuchung verschiedener biomolekularer Interaktionen anhand der direkt gemessenen Wärmeänderungen, die bei einem molekularen Bindungsereignis sowohl aufgenommen als auch freigesetzt werden kann. Darüber hinaus werden weder zusätzliche Modifikationen von einzelnen Bindungspartnern, beispielsweise Fluoreszenzmarkern oder eine Immobilisierung benötigt, sodass die Messungen der Affinitäten im nativen Zustand eines Proteins erfolgen können. Der schematische Aufbau sowie die Datengenerierung und Auswertung sind in folgender Abbildung gezeigt.

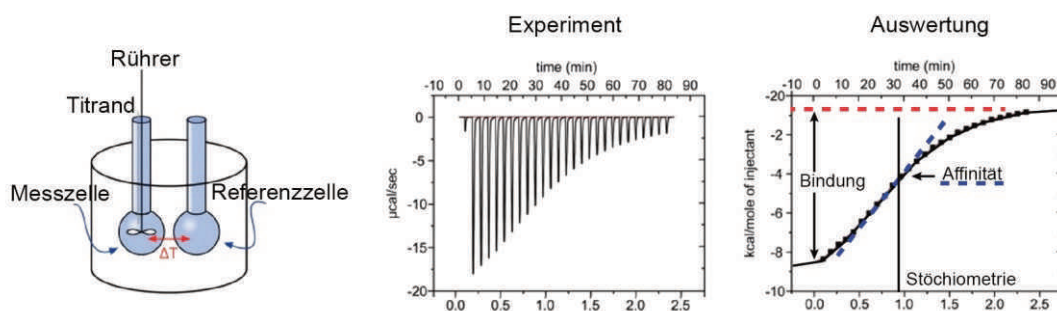


Abbildung 18: Der schematische Aufbau zeigt das Messprinzip der isothermalen Titrationskalorimetrie, gefolgt von experimentellen Daten einer exothermen Bindungsisotherme und der anschließenden der Auswertung der Flächenintegrale. (abgeändert nach Malvern¹¹⁹)

Von dem zu untersuchenden Protein (50-300 μM) werden 200 μL in die saubere Probenzelle und Ligandlösung (40 μL) in die Spritze des Kalorimeters gegeben. In die Referenzzelle wird dH_2O ($\sim 200 \mu\text{L}$) hineingegeben. Die beladene Probenspritze wird in die Messzelle gesteckt und dann die Probenzelle und die Referenzzelle bei der Messtemperatur (10 $^\circ\text{C}$) äquilibriert. Die Probenspritze wird in Rotation (300 - 1500 rpm) gebracht, wodurch die Messlösung durchmischt wird und anschließend in 15-20 kleinen Injektionen 0.1 - 2 μL Ligandlösung in die Messzelle injiziert wird.

Einstellungen

Injektionen	20
Temperatur	20°C
Referenzenergie	10 µcal/s
Startverzögerung	60 s
1. Injektion	0.4 µL 0.8 s
2-20. Injektion	2 µL 4 s
Zeit zwischen Injektionen	200 s
Filter	6s

Mit den ersten Injektionen misst das Mikrokalorimeter die Energiemenge, die notwendig ist um die Temperatur zwischen Proben- und Referenzzelle konstant zu halten, sodass mit zunehmenden Injektionen die Bindungspartner immer mehr gesättigt sind und die Bindungsisothermen zunehmend kleiner werden. Die entstandene oder aufgenommene Wärmemenge q ist dabei proportional zur Konzentration des eingesetzten Liganden $\Delta[L]$, sodass anhand folgender Gleichung die Enthalpie ΔH ermittelt werden kann¹²⁰.

$$q = v \cdot \Delta H \cdot \Delta[L]$$

$$\Delta G = -RT \ln K_a$$

q : Wärmemenge, ΔH : freie Enthalpie, $\Delta[L]$: Ligandkonzentration, ΔG : freie Energie, R : Universelle Gaskonstante 8.314 J/molK, T : Temperatur, K_a : Bindungskonstante

Mittels GIBBS-HELMHOLTZ-GLEICHUNG kann die Komplexbildungsentropie ΔS berechnet werden. Folglich können alle thermodynamischen Parameter der Interaktion über eine einzige Titration experimentell beschrieben werden¹²¹.

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

Als Resultat der Titration des Liganden in die mit Protein gefüllte Messzelle erhält man die Bindungskonstante K_a , den Stöchiometriefaktor n , die Komplexbildungsenthalpie ΔH sowie den entropischen Beitrag ΔS ^{120,121}.

3.5.5 Interaktionsuntersuchungen mittels Oberflächenplasmonresonanz

Die Wechselwirkung zwischen Protein- und Ligand ist in der Natur ein essentieller Prozess, wodurch dynamische Vorgänge ermöglicht werden. Die Bandbreite an unterschiedlichen Interaktionspartnern mit denen Proteine in Wechselwirkung treten können, reicht von einzelnen Ionen, Kleinmolekülen über DNA bis hin zu megadalton großen Komplexen. Dabei stellt jedes Interaktionspaar besondere Anforderungen an die instrumentelle Methodik, da unterschiedliche Größenparameter, Kinetiken,

Affinitäten und die damit verbundenen Arbeitskonzentrationen in einem für die Methode passenden Bereich liegen müssen.

Die Methodik der Oberflächenplasmonresonanz (*surface plasmon resonance*, SPR) ist in dieser Arbeit für die Untersuchung der Interaktion zwischen Sun4C Proteinen und β -Glukanstrukturen herangezogen worden. Die Messungen erfolgten dabei an einem Biacore T100 (*GE Healthcare*).

Die Messanordnung besteht aus senkrecht polarisiertem Licht (760 nm LED), das durch ein optisches Prisma auf eine Goldoberfläche positioniert wird, sodass der Grenzwinkel zur Totalreflexion an der Goldoberfläche überschritten wird¹²². Da beim senkrecht polarisierten Licht die Schwingungsebene von Magnetfeld senkrecht zur Einfallsebene liegt, sodass hier im Brewster-Winkel das Licht verstärkt in die Oberfläche gebrochen wird, wird dadurch die Anregung von Oberflächenplasmonen entlang der Grenzfläche innerhalb der Goldoberfläche deutlich erhöht. Gekoppelt an die Plasmonenanregung ist der Ausfallwinkel Theta des Laserstrahls. Da dieser direkt vom Brechungsindex an der Goldoberfläche abhängt, werden Massenzunahmen auf dem Sensorchip über Winkeländerungen in Form von Resonanzeinheiten wiedergegeben. Hierbei ist diese Methode besonders sensitiv für Interaktionspaare bei denen der Massenzuwachs besonders groß ist, da hier selbst bei geringer Immobilisierung große Winkeländerungen generiert werden. Gleichzeitig ist die Auflösung dennoch ausreichend um für Kleinmoleküle mit einer Größe kleiner 1 kDa Affinitäten im mikromolaren Bereich bestimmen zu können^{123,124}.

Zu Beginn erfolgte ein pH-*scouting* des zu immobilisierenden Proteins in unterschiedlichen Acetattuffern (10 mM; pH 4; 4.5; 5; 5.5) um eine möglichst große Präkonzentrierung des Proteins auf dem verwendeten CM5-Chip aufzubauen. Daran knüpfte sich eine Standard NHS-Immobilisierung des Proteins an die Dextranmatrix des CM5-Sensorchips, die mit folgenden Einstellungen durchgeführt wurde.

Proteinkonzentration	300 μ g/mL
Immobilisierungspuffer	10 mM Acetatpuffer pH 5
Laufpuffer	50 mM Acetatpuffer pH 5.5
Chip	<i>Series S Sensor Chip CM5 (GE Healthcare)</i>
Flussrate	10 μ L/min
Kontaktzeit	600 s
Blankimmobilisierung	Flusszelle 1, 3
Optimale Beladungsdichte	2000 – 7000 RU

Nach der Immobilisierung wurde die Affinität von Sun4-C Proteinen aus *Candida albicans* und *Saccharomyces cerevisiae* sowie einigen Varianten, für Laminarin (*Dextra Laboratories Ltd*, bei folgenden Einstellungen als Triplikate vermessen.

Ligandenkonzentrationen	0 – 10 mM ($M_{\text{Laminarin}} = 4066 \text{ g/mol}$) ³⁷
Laufpuffer	50 mM Acetatpuffer pH 5.5
Zellen	2-1 oder 4-3
Flussrate	10 $\mu\text{L/min}$
Assoziation	600 s
Dissoziation	600 s
Waschpuffer	2 M NaCl, 10mM Tris pH8
Regenerierung	30 $\mu\text{L/min}$ 30 s

Die Auswertung der aufgenommenen Sensorgramme erfolgte über die implementierte Evaluierungssoftware, mit der Annahme einer *steady state* 1:1 Interaktion¹²⁵.

3.5.6 CD-Spektroskopie

Aminosäuren zeigen wegen des chiralen C α -Atoms (Ausnahme Glycin) eine optische Aktivität, so dass Proteine mittels CD-Spektroskopie bezüglich ihrer Sekundärstrukturelemente untersucht werden können. Über CD-Messungen im Fern-UV Bereich (190 -250 nm) lassen sich die charakteristischen $n \rightarrow \pi^*$ und $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergänge der Peptidbindungen beobachten. Über dieses Spektrum können anhand der Beiträge von α -helikalen Strukturen, β -Faltblättern, Schleifen oder einer random coil-Struktur die Gewichtungsfaktoren der einzelnen Sekundärstrukturelemente näherungsweise ermittelt werden (*Jasco Secondary Structure Estimation, Vers. 1.0*).

Neben der Sekundärstrukturanalyse kann durch die CD-Spektroskopie die thermische Stabilität von Proteinen untersucht und der Schmelzpunkt (T_M) ermittelt werden. Mit zunehmender Temperatur ändern sich während des Denaturierungsvorgangs die Sekundär- und Tertiärstruktur des Proteins, sodass eine Änderung der Elliptizität beobachtet werden kann. Die Rückfaltungskurve zeigt unter anderem, ob ein Protein in der Lage ist, sich selbständig zurückzufalten. Für die Umrechnung der gemessenen Elliptizität in die mittlere molare Elliptizität pro Aminosäure wurde folgende Formel herangezogen.

$$[\theta]_{MR} = \frac{\theta}{c \cdot d \cdot N_{AS} \cdot 10} \left[\frac{\text{deg} \cdot \text{cm}^2}{\text{dmol}} \right]$$

$[\theta]_{MR}$ mittlere molare Elliptizität pro Aminosäure, θ gemessene Elliptizität in mdeg, c Proteinkonzentration in M, d Schickdicke in cm, N_{AS} Anzahl der Aminosäurereste des Proteins.

Sterilfiltriertes Protein wird zu 1:10 verdünnten AM-Puffer hinzugegeben, sodass die Proteinendkonzentration in der 250 μ L Küvette zwischen 0.1-0.5 mg/mL liegt. Die CD-spektroskopischen Messungen wurden mit den unten angegebenen Einstellungen durchgeführt.

	Fern-UV	Nah-UV/Vis	Temperaturstabilität
Wellenlängenbereich	200 - 280 nm	280 - 800 nm	$\Delta\theta_{max}$ (205-225 nm)
Proteinkonzentration	2 - 15 μ M	150 - 300 μ M	150 μ M – 300 μ M
Scangeschwindigkeit	50 nm/min		-
Bandbreite	1 nm		2 nm
Dämpfung	2 s		1 s
Akkumulation	3 x		1 x
Schrittweite	0.1 nm		0.5 nm
Temperaturbereich	10°C		25-95°C

3.5.7 H/D-Austausch Massenspektrometrie (HDX-MS)

Zu Beginn der 1950er formulierte LINDERSTRØM-LANG die ersten, bis heute gültigen Grundlagen für den Wasserstoff-Deuterium Austausch von Proteinen¹²⁶. Im Fokus stehen hierbei die Protonen der Amid-Hauptkette, da deren Dissoziationsraten im Sekundenbereich zeitlich aufgelöst werden und darüber Rückschlüsse zu strukturellen sowie dynamischen Aspekten gezogen werden können. Die Deuteriumaustauschraten der Seitenketten liegen im Millisekundenbereich, sodass diese zu schnell austauschen um sie mit Hilfe des vorhandenen Geräte-Setups (Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Chemie, Abteilung Massenspektroskopie, Leitung Dr. Uwe Linne) untersuchen zu können. Die Austauschraten der Amidprotonen wiederum sind abhängig von der chemischen Umgebung. So erfolgt ein schnellerer Austausch für besonders exponierte sowie dynamische Bereiche, hingegen für kernnahe-, hydrophobe- oder an Wasserstoff-Brückenbindungen beteiligte Bereiche sind die Austauschraten reduziert^{126,127}. Anhand dieser Eigenschaften können nun unter anderem Interaktionskarten von Ligandbindestellen auf Proteinoberflächen bestimmt werden, da sich die chemische Umgebung nach der Ligandbindung im Vergleich zum Protein alleine sich in den Peptiden der Interaktionsfläche unterscheidet¹²⁸.

Der schematische Arbeitsverlauf der H/DX-MS Methodik, bestehend aus Probenvorbereitung, proteolytischem Verdau, LCMS mit abschließender Datenprozessierung, ist in folgender Abbildung grafisch zusammengefasst.

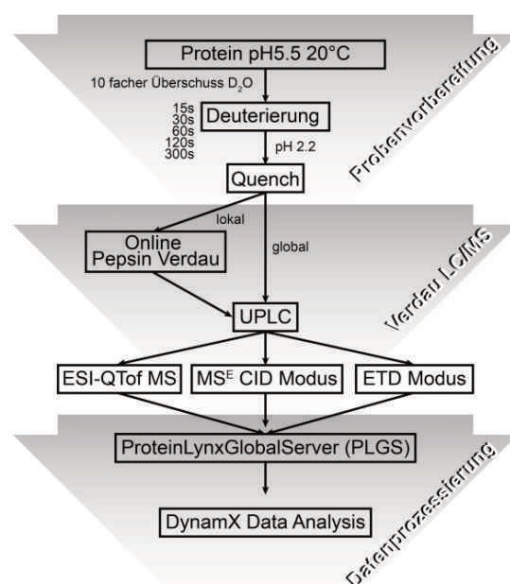


Abbildung 19: Schematischer Arbeitsablauf für eine Protein HDX-MS Analyse mit den einzelnen Arbeitsschritten der Probenvorbereitung (Deuterierung, Quench), dem *online* Pepsinverdau mit anschließender MS-gekoppelter UPLC (vorrangig kollisionsinduzierter CID-Modus) zur Auftrennung einzelner Peptide, gefolgt von der Datenprozessierung (Erstellung PLGS-Dateien, DynamX Auswertung).

Die HDX-MS Untersuchung von ScSun4C ist mittels einer kommerziell erhältlichen H/D-X Automation von Waters durchgeführt worden. Im Rahmen der Probenvorbereitung werden 50 µM ScSun4-C (50 mM Acetat, pH 5.5) mit Hilfe eines Pipettierroboters (*LEAP HDX, LEAP Technologies*) 10-fach in D₂O-Acetatspuffer (50 mM Acetat, pH 5.5) verdünnt und sukzessive nach 15 s, 30 s, 60 s, 120 s und 300 s Inkubationszeit mit vorgekühlter Quenchlösung (400 mM KH₂PO₄/H₃PO₄, 100 mM TCEP, pH 2.2) im jeweiligen Deuterierungsgrad eingefroren. Die proteolytische Spaltung des Reaktionsgemisches erfolgt bei einer Flussrate von 100 µL/min in H₂O + 0.1 % Ameisensäure bei 20 °C über eine BEH Pepsin Säule (*ENZYMATE™ BEH-Pepsin, Waters*). Die Peptide werden im Anschluss an den Verdau über ein *ultra performance liquid chromatography*-System (*AQUICITY UPLC® M-Class, Waters*) im *trapping mode* auf einer Fangsäule gebunden (*ACQUITY UPLC BEH C18 VanGuard Pre-column, 130Å, 1.7 µm, 2.1 mm X 5 mm, Waters*), um hiernach im *elution mode* bei 0.5 °C per RP-UPLC an einer C18-Säule (*ACQUITY UPLC BEH C18 Column, 130Å, 1.7 µm, 1 mm X 100 mm, Waters*) unter folgenden Parametern chromatografisch aufgetrennt zu werden:

A (H₂O 0.1 % Ameisensäure) und B (Acetonitril, 0.1 % Ameisensäure) mit linearem Anstieg von 5 % B auf 35 % B innerhalb 7 Minuten, gefolgt von einem Anstieg auf 85 % B innerhalb einer Minute und verbleibend bei 85 % B für zusätzliche 2 Minuten. Abschließend wird die Säule eine Minute lang bei 95 % B gespült.

Die aufgetrennten Peptide werden kontinuierlich mittels Elektrospray-Ionisation (ESI), durch Anlegen einer positiven Spannung (2 kV) sanft ionisiert und über Quadrupole, die als Massenfiter fungieren, um Ionen bestimmter m/z zu isolieren, geschickt. Hierbei kann durch Anlegen zusätzlicher Beschleunigungsspannungen eine kollisionsinduzierte Peptidfragmentierung (*engl. collision-induced dissociation*, CID) oder durch Generierung von Radikalanionen eine Elektronentransfer-Dissoziationsfragmentierung (*engl. electron-transfer dissociation*, ETD) der Peptide erzielt werden. Im Anschluss daran werden die Ionenpakete über eine spannungsgesteuerte Pulserplatte orthogonal in das *time-of-flight* (TOF) Reflekttron abgelenkt und im Massenspektrometer detektiert⁸⁷.

Die Datenprozessierung beginnt im ersten Schritt automatisiert über den ProteinLynx Global SERVER™ (PLGS), wobei die erstellte Peptid-Identifikationsliste im Anschluss daran in DynamiX3.0 (Waters) importiert wird. Die experimentell signifikanten Peptide werden über folgende Filtereinstellungen eingegrenzt (Min. Intensität = 10^3 , Min/Max Sequenzlänge = 5/20, Replikate = 3), wobei die Redundanz der abgedeckten Aminosäuren größer 4 und die Sequenzabdeckung größer 80 % betragen sollte. Danach werden die Centroide anhand der Isotopenverteilung zugeordnet, daraus die Deuteriuminkorporation für das jeweilige Peptid berechnet und die relative Deuteriumaufnahme gegen die Zeit aufgetragen. Die Gesamtheit aller ausgewerteten Peptide wird dann in Form einer *heatmap* Darstellung angezeigt, aus der dann wiederum die Zuordnungen der Deuteriumaufnahme pro Aminosäure auf ein Strukturmodell übertragen werden können.

Die Visualisierung der HDX-MS Ergebnisse erfolgte mittels PyMOL1.6 über folgende Skripte.

```
# Setze Kristall B-Faktoren auf -1
alter /Objekt//ChainA/, b = -1

# Aminosäuren HDX B-Werte zuweisen
alter /Objekt//ChainA/1, b = 0.359
alter /Objekt//ChainA/2, b = 0.321
...
```

Laden der .pml Datei

```
PyMOL>cmd.do ('@HDX-MS.pml')
```

Einfärben der H/DX-Austauschraten über die B-Faktoren

```
# Auswahl der HDX B-Faktoren
PyMOL> select hdx, b>0
PyMOL> spectrum b, blue_white_red, selection=hdx
```

```
# Auswahl der Lücken
PyMOL> select leer, b<0
```

3.5.8 Fluoreszenzmikroskopie

In der Biologie findet die Fluoreszenzmikroskopie eine breite Anwendungsmöglichkeit, da hierbei *in vivo* Informationen zu einzelnen Zellkompartimenten über die Detektion von Hybridisierungspartnern bis hin zu *single-molecule* Messungen möglich sind. In dieser Arbeit sollen die Wechselwirkungen zwischen Strukturen der äußeren Hefezellwand mit fluoreszenzmarkierten pilzlichen Zellwandproteinen untersucht werden.

Zuerst werden Übernachtskulturen der zu untersuchenden Stämme angesetzt, bevor mit der Objektpräparation begonnen werden kann. Die Objektträger (Diagnostic Microscope Slides, 10 *well*, 6.7 mm, Erie Scientific Company) werden mit jeweils 30 µL 0.1 % Polylysin (EPL) pro *well* versehen. Polylysin ist ein Homopolymer bestehend aus L-Lysin-Einheiten und wird zum Fixieren von Zellen verwendet. Nach 3-5 min Inkubation wird die Lösung entfernt und die Objektträgervertiefungen 3 x mit YNB-C gewaschen. Dann werden 30 µL an Übernachtskultur hinzugegeben und die Zellen 20 min inkubiert. Die Flüssigkeit wird abgezogen und mit 30 µL PBS-1 % Triton X100 gespült. Danach werden die Wells 3x mit je 30 µL PBS-1 % BSA gewaschen, wobei die Zellen im letzten Waschschrift 20 min geblockt werden. Nach dem Entfernen der Lösung werden 5 µL fluoreszenzmarkiertes Protein (1 mg/mL) in die *wells* gegeben, mit 25 µL PBS-1 % BSA vermischt und 5 min inkubiert. Anschließend wird nicht gebundenes Protein durch 3x Waschen mit PBS-1 % BSA entfernt. Im letzten Arbeitsschritt werden 25 µL abpipettiert, auf den verbleibenden Flüssigkeitsfilm ein Objektglas gelegt und die Probe am Fluoreszenzmikroskop abschließend untersucht.

Über die verbleibende Fluoreszenz können hierbei Aussagen zur Lokalisation des Proteins getroffen werden.

3.6 Bestimmung der dreidimensionalen Struktur von Proteinen

Beginnend bei Strukturen im Millimeterbereich, siehe Abbildung 20, ist das menschliche Auge noch in der Lage diese aufzulösen. Darüber hinaus müssen andere Methoden herangezogen werden um innerhalb eines bestimmten Größenbereiches Strukturen darstellen zu können. Diese Methoden haben wiederum eigene Auflösungsgrenzen, sodass je nach gewünschter Auflösung und damit verbundenen Partikelgrößen die dafür verfügbare Methode verwendet werden muss.

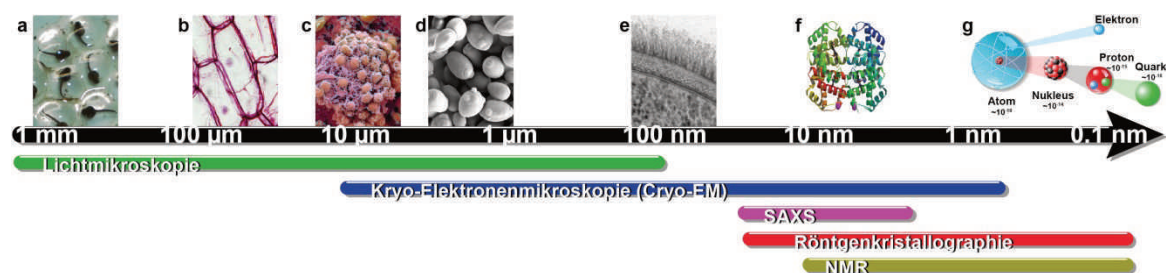


Abbildung 20: Größenbereich von 1 mm bis 0.1 nm mit den jeweiligen Methoden zur Auflösung der einzelnen Strukturen. a) Froschembryo¹²⁹ b) Pflanzenzelle¹³⁰ c) Stammzellen¹³¹ d) *Saccharomyces cerevisiae* Zellen¹³² e) *Candida albicans* Zellwand¹³³ f) Kristallstruktur des menschlichen Hämoglobins (4HHB) g) Elementarteilchen¹³⁴.

Die Bestimmung der dreidimensionalen Struktur von Proteinen, Nukleinsäuren sowie von Makromolekülen hat das generelle Verständnis für die Funktionsweise auf atomarer Ebene und den daraus resultierenden Modelverständnissen revolutioniert.

Für diesen Größenbereich stehen verschiedene Methoden zur Strukturbestimmung zur Verfügung. Anhand von Kleinwinkelröntgenstreuung (*small-angle X-ray scattering*, SAXS)¹³⁵ ist es möglich Proteine, nativ in Lösung zu vermessen und anhand der Streukurven niedrig aufgelöste Modelle zu rekonstruieren um darüber Rückschlüsse zur Quartärstruktur¹³⁶, Protein/Protein-Interaktionen¹³⁷ oder der Ausbildung großer Mehrkern-Komplexe¹³⁸ ziehen zu können. Da die aktuelle Auflösungsgrenze für diese Methode die zehn Ångströmngrenze nicht unterschreitet, werden für atomar aufgelöste Strukturen vorrangig Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) sowie die Röntgenkristallographie verwendet. Bei der NMR wird ¹³C- und ¹⁵N-Isotopen markiertes Protein benötigt. Für eine Zuweisung des Peptidrückgrates mittels NMR ist in der Regel die Messung der dreidimensionalen C_βC_αNH¹³⁹ und C_βC_α(CO)NNH¹⁴⁰ Spektren notwendig um ein Strukturmodell zu erstellen.

Bei Proteinen mit mehr als 150 Aminosäuren reichen die oben genannten Spektren nicht mehr aus, da die Zuordnung von Spinkopplungen aufgrund von überlappenden Peaks immer schwieriger wird. In solchen Fällen kann die Aufnahme zusätzlicher Spektren (HNC_α, HN(CO)C_α, HNCO, HN(C_α)CO) oder eine zusätzliche Deuterierung der Probe angewendet werden. Trotz der vielen

Vorteile, welche die NMR-Spektroskopie in Bezug auf Proteindynamik oder dem Aufzeigen von flexiblen Domänen innerhalb eines Proteins bietet, ist unter anderem die immer komplexer werdende Auswertung der NMR-Spektren bei zunehmender Proteingröße ein Grund dafür, dass nur ~10 % (11567, Stand 08.03.2017) der Proteinstrukturen innerhalb der RCSB-PDB (*Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB) Protein Data Bank (PDB)*)¹⁴¹ von dieser Technik herrühren. Mit ~89 % (111688) aller veröffentlichten Strukturen stellt die Röntgenstrukturanalyse die Grundsäule für alle weiteren Strukturbasierten Arbeiten dar. Vorteile dieser Methode sind neben der sehr hohen Auflösung, deren Obergrenze aktuell bei 0.48 Å liegt und für die Proteinen crambin¹⁴² sowie HiPIP¹⁴³ erreicht wurde, die Möglichkeit große Proteine oder auch ganze Proteinkomplexe vollständig zu charakterisieren. Aufgrund des hohen Lösungsmittelgehalts innerhalb des Proteinkristalls (25 - 65 %)¹⁴⁴ liegt zwischen den einzelnen Proteinen nur eine geringe Kontaktfläche vor, sodass hier in der Regel von der nativen Form ausgegangen werden kann. Trotzdem kann die Flexibilität für größere Domänen eines Proteins im Kristall eingeschränkt sein, sodass hier zusätzliche Experimente herangezogen werden müssen um Kristallartefakte¹⁴⁵ ausschließen zu können.

3.6.1 Auswahl und Optimierung geeigneter Kristallisationsbedingungen

Die Kristallisation eines Proteins hängt von unterschiedlichen Faktoren wie etwa der Proteinkonzentration, dem pH-Wert, der Temperatur oder dem gewählten Präzipitant ab. In dieser Arbeit ist für die Proteinkristallisation das Dampfdiffusionsverfahren¹⁴⁶ verwendet worden, bei dem die Proteinlösung mit einer Präzipitationslösung vermischt und anschließend der zeitlichen Verlauf der Kristallbildung dokumentiert wurde.

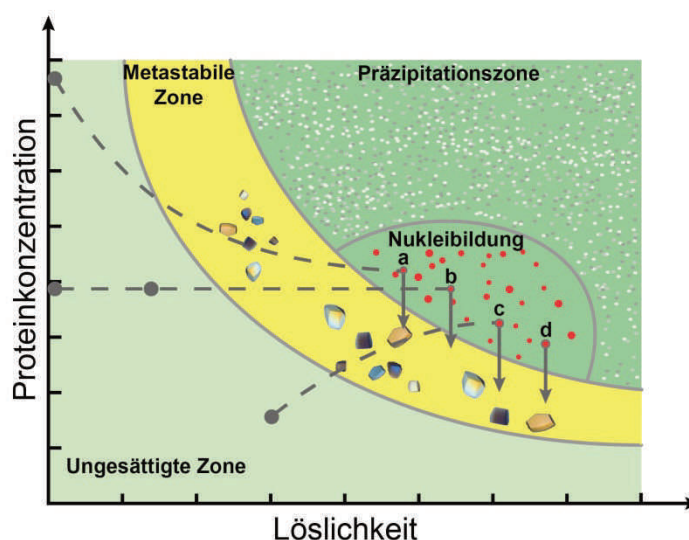


Abbildung 21: Phasendiagramm der Proteinkristallisation vom aufgereinigten Protein bis hin zum streuenden Proteinkristall mit Darstellung des Kristallisationsverlaufs für vier verschiedene Kristallisationsmethoden mit der Auftragung der eingesetzten Proteinkonzentration gegen die Löslichkeit bei verwendeten Präzipitantien, Additiven, pH oder Temperatur. a) *Free Interface Diffusion* (FID) b) Dialyse c) Dampfdiffusion d) Microbatch unter Öl. Abgeändert nach CHAYEN und SARIDAKIS et al.¹⁴⁶

Aufgrund der Konzentrationsdifferenz von Protein-Präzipitant-Tropfen zum Reservoir diffundieren Lösungsmittelmoleküle in das Reservoir, sodass sich die Proteinkonzentration im Proteintropfen stetig erhöht und dadurch die übersättigte metastabile Zone, in der sich Nuklei bilden können, erreicht werden kann. Stetige Anlagerung von Proteinen an den Mikrokristall sorgt für deren Größenwachstum bis hin zum makroskopischen Proteinkristall (Abbildung 21). Um Kristallisationsbedingungen zu erhalten, die reproduzierbare Proteinkristalle mit hoch geordnetem Kristallgitter zeigen, wurden verschiedene Dampfdiffusion *Screening Suites* verwendet. Diese beinhalten neben systematisch gewählten Komponenten, wie einem Präzipitant in unterschiedlichen Konzentrationen bei verschiedenen pH-Werten, beispielsweise der *PACT Suite*, die Wahl von unterschiedlichen Kristallisationskomponenten um einen großen chemischen Bereich abzudecken (*JCSG+ Suites*). Darüber hinaus werden bereits erfolgreiche Kristallisationsbedingungen zum Screening herangezogen (*JCSG Core Suites*).

Bezeichnung		Hersteller
<i>JCSG Core I-IV</i>	Optimierte Literaturbedingungen	Qiagen
<i>JCSG+</i>	<i>Sparse-matrix</i> Bedingungen	Qiagen
<i>PACT</i>	Systematischer Screen basierend auf Newman et al. ¹⁴⁷	Qiagen
<i>Classics, Classics-light</i>	Literaturbekannte <i>sparse-matrix</i> Bedingungen nach Jancarik-Kim ¹⁴⁸	Qiagen
<i>Cryos</i>	Literaturbekannte Bedingungen mit Glycerin nach Jancarik-Kim ¹⁴⁸	Qiagen
<i>AmSO4</i>	Systematischer Ammoniumsulfat-Kristallisationsscreen	Qiagen
<i>Anions</i>	Systematischer Salz-Screen: Variation von pH- und Konzentration	Qiagen
<i>JBScreen Pentaerythritol</i>	Variation Pentaerythritol Propoxylat bzw. Ethoxylat als Präzipitant	Jena Bioscience
<i>Morpheus I, Morpheus II</i>	Literaturbekannte Bedingungen: pH, PEGs, Salz	Molecular Dimensions
<i>MBCI, MBCII</i>	Optimiert für Membranproteine	Qiagen
<i>MEMGold, MEMGoldII</i>	Optimiert für Membranproteine	Molecular Dimensions

Das Kristallisationsscreening wurde in 96-Well-Plates durchgeführt und von dem Kristallisationsroboter (HoneyBee™ 963, Digilab) werden zu Beginn jeweils 80 µL der Präzipitantbedingung ins Reservoir gegeben und anschließend davon 300 nL in die beiden Kristallisations-Vertiefungen. Dazu werden 300 nL Proteinlösung (10-30 mg/mL) hinzugegeben und abschließend mit einer transparenten Folie (ViewSeal™, Greiner) verschlossen.

Der Kristallisationsprozess wird über das Dokumentationssystem RockImager (*Formulatrix*) zeitlich bei 4 oder 18 °C verfolgt. Erfolgreiche Bedingungen, die kristallines Material zeigen, können dann für eine Optimierung herangezogen werden um Größe oder Kristallqualität zu verbessern, da diese oftmals für eine anschließende Strukturlösung nicht ausreichend ist. Hierbei werden, wie in folgender Abbildung gezeigt, die einzelnen Konzentrationen von Puffer, Präzipitant, pH-Wert, Salz sowie Additiven in kleinen Schritten systematisch um die Ausgangsbedingung herum variiert (Abbil-

dung 22A). Dieses *finescreening* kann dann im 96-well *sitting-drop* Maßstab mittels Roboter pipettiert werden oder manuell im 24-well *hanging-drop* Maßstab, wobei hierbei die zusätzlich das Volumenverhältnis (max. 2 µL) Protein zu Präzipitationslösung im Verhältnis 3:1 bis 1:3 variiert werden kann (Abbildung 22B). Die Dokumentation des Kristallisationsprozesses erfolgt für den 96-well Ansatz mit Hilfe des Rockimager (*Formulatrix*) und für die 24-well-Platten unter dem Lichtmikroskop.

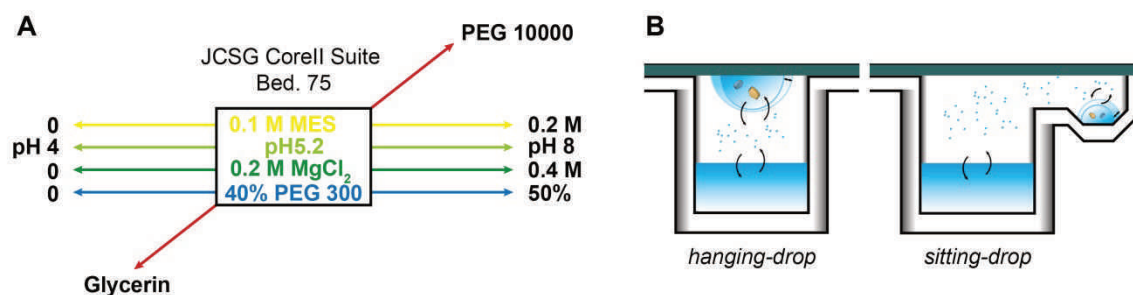


Abbildung 22: A) Darstellung eines Optimierungsansatzes für die Kristallisation von ScSun4C-Varianten. B) Schematische Darstellung der Dampfdiffusionsmethode mittels *hanging-* sowie *sitting-drop*.

In einigen Fällen können Proteinkristalle minderer Qualität erzeugt werden, die aufgrund ihrer Morphologie, unter anderem durch das Verwachsen mehrerer Proteinkristalle, Probleme im Beugungsvermögen oder eine zu hohe Mosaizität aufweisen. In diesem Zusammenhang kann das sogenannte *seeding* angewendet werden. Hierbei nutzt man die Gelegenheit, dass der Nukleationsprozess, der innerhalb einer stark übersättigten Proteinlösung statistisch begünstigt ist¹⁴⁹, und überführt anschließend je nach Möglichkeit, Mikro- oder Makrokristalle in eine leicht übersättigte Protein-Präzipitanzlösung. Hierin können aus den überführten Kristallen aufgrund der geringeren Proteinkonzentration zwar eine geringere Anzahl, aber dafür größere Proteinkristalle mit höherer Kristallordnung herangezogen werden.

3.6.2 Saccharid-*Soaking* von Proteinkristallen

Sofern bereits Erkenntnisse aus Interaktionsstudien von Proteinen mit deren Liganden zur Verfügung stehen, können diese Interaktionspartner in bereits vorhandene Proteinkristalle nachträglich hineingebracht werden. Hierbei macht man sich den hohen Wassergehalt, der zwischen 25-65 % innerhalb des Proteinkristalls¹⁴⁴ liegen kann zu Nutze, sodass über Diffusion Kleinmoleküle ins Innere des Proteinkristalls gelangen können um mit dem Protein wechselwirken zu können. Diese Interaktionen müssen stark genug sein um erstens beim *backsoaking* nicht wieder abgespült zu werden und zweitens eine möglichst große ortsspezifischen Sättigung der Proteine innerhalb des Kristalls zu erreichen um dadurch im späteren Röntgenbeugungsexperiment die zusätzliche Elektronendichte visualisieren zu können.

Innerhalb dieser Arbeit sind *soakings* mit verschiedenen Kohlenhydraten durchgeführt worden. Bei Sun4-Proteinen kamen Mannose, Glucose sowie verschiedene gut bis weniger gut lösliche β -1,3-Glucane mit Polymerisationsgraden (eng. *dense of polymerisation*, DP) kleiner \sim DP100 zum Einsatz. Dabei wurden Kristalle aus der jeweiligen Bedingung genommen und in einer *soaking*-Lösung 5-50 mM Saccharid, je nach Verträglichkeit und der damit verbundenen Stabilität des Proteinkristalls 1 min, 5 min, 1 h, 6 h oder über Nacht bei 4°C inkubiert und anschließend 30 s in der Ursprungsbedingung gewaschen. Danach wurden die Proteinkristalle in flüssigem Stickstoff weggefroren und in einem Transportdewar zur Röntgeneinrichtung befördert.

3.6.3 Röntgendiffraktion an Proteinkristallen

Geordnete kristalline Strukturen, wie es sich bei Proteinkristallen handelt, sind in der Lage Röntgenstrahlung zu beugen, sofern die eingesetzte Wellenlänge innerhalb der gleichen Größenordnung zum Netzebenenabstand des Kristalls liegt. Mathematisch beschrieben wird dieser Zusammenhang mittels BRAGG'scher-Gleichung, die Wellenlänge des Röntgenstrahls λ , den Netzebenenabstand d , sowie den Winkel der Netzebene θ in folgender Formel zusammenfügt¹⁵⁰.

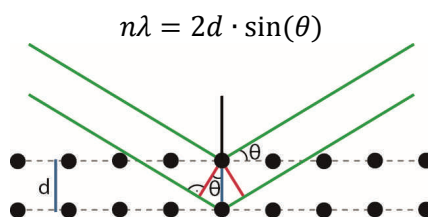


Abbildung 23: Schematische Darstellung der BRAGG'schen-Reflexe an Atomen zweier Netzebenen.

Sofern für obige Gleichung die Reflexionsbedingung erfüllt ist, kommt es zur Überlagerung der Wellen aller parallelen Netzebenen, und anschließend zu konstruktiver Interferenz. Diese entstandene Beugungsstrahlung kann im Anschluss daran von einem Detektor aufgenommen werden^{150,151}.

Die folgende Fourier-Transformation beschreibt dabei den Zusammenhang zwischen der Elektronendichte für jede Position $\rho(x, y, z)$ im Kristall, den MILLER'schen Indizes (hkl) und der normierten Strukturfaktoramplitude $|F_{hkl}|$ in Abhängigkeit zum Phasenwinkel θ der daran gebeugten Welle.

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l |F_{hkl}| e^{2\pi i(hx + ky + lz) + i\theta(hkl)}$$

Eingefrorene Proteinkristalle wurden nach Bedarf in der Arbeitsgruppe von Prof. Klebe (Universität Marburg, Fachbereich Pharmazie) mittels I μ STM Mikrofokusröhre (*Bruker*) sowie einem MAR345 Detektor (*marXperts*) vorcharakterisiert, sodass nur Kristalle hoher Qualität mit nach Berlin zum

BESSY-II Synchrotron (Helmholtz Zentrum Berlin) oder nach Grenoble an das europäische Synchrotron (*European Synchrotron Radiation Facility*, ESRF) mitgenommen wurden. Diese wurden dann über die magnetische Kappe auf den Goniometerkopf aufgesetzt und im Röntgenstrahl ausgerichtet.

Zu Beginn wurden in einem Oszillationswinkel von 1° zwei Testbilder, in einem Winkel von 90° zueinander, aufgenommen um daraus mit Hilfe der Software *imosflm*¹⁵² die Raumgruppe oder Zellparameter zu bestimmen. Aus den erhaltenen Parametern kann eine Routine errechnet werden um einen vollständigen Datensatz bei größtmöglicher Auflösung und Multiplizität zu erhalten.

#Bilder	100 - 3600
Exposition	0.1 s – 25 min
Oszillationswinkel	0.1° - 1°
Detektorabstand	Detektor voll ausgenutzt

3.6.4 Datenprozessierung

Die aufgenommen Bilder des Röntgenbeugungsexperiments wurden in *imosflm*¹⁵² eingelesen, zwei Bilder 0° und 90° ausgewählt, alle verfügbaren Reflexe markiert und im Anschluss daran indiziert. Im darauf folgenden Schritt wurde die Raumgruppe mit hoher Symmetrie bei niedrigen *penalty* ausgewählt und die Zellparameter verfeinert. Daraufhin erfolgte die Integration der einzelnen Reflexintensitäten (Integrationsellipsoide) für alle eingelesenen Bilder, daraus ließen sich zusätzliche Parameter wie Reflex-MILLER Indizes (*hkl*), *FOM* (*Figure of Merit*) oder das Rauschverhältnis $I/\sigma(I)$ errechnen und wurden in tabellarischer Form innerhalb der *reflection.mtz* Datei gespeichert.

Die spätere Skalierung der Daten erfolgte mittels *SCALA*¹⁵³ oder *XSCALE*¹⁵⁴ innerhalb des CCP4-Pakets (*Collaborative Computational Project, Number 4*)¹⁵⁵, indem Reflexe zusammengefasst und daraus eine gemittelte Intensität für jeden Reflex herausgeschrieben wird. Zudem kann in diesem Schritt anhand folgender Auftragungen die real erreichbare Auflösung eingegrenzt werden.

Die gesetzten Anforderungen bezogen auf die Datenqualität eines skalierten Datensatzes sind untenstehend aufgelistet.

Wilson-Plot	Linearität bei hohen Auflösungen
$I/\sigma(I)$	< 2
$R_{\text{merge}}/I_{\text{max}}$	0.01 - 0.04
Vollständigkeit	$> 95\%$
B-Faktor	> -9

3.6.5 Phasenbestimmung zur Lösung der Proteinstruktur

Aufgrund der zweidimensionalen Detektion, der am Einkristall gebeugten Röntgenstrahlung (Bremsstrahlung), kommt es während des Experiments zum Verlust der Phaseninformation, sodass aus dem eigentlichen Experiment die Phase nicht direkt bestimmbar ist. Als Ergebnis erhält man lediglich die Intensität der gebeugten Welle, da diese jedoch proportional zum Betragsquadrat des Strukturfaktors ist, können Näherungsfunktionen wie die PATTERSON-Funktion eingesetzt werden um das Phasenproblem zu lösen.

$$I \propto |F_{hkl}|^2$$

Dabei liefern die fouriertransformierten Beiträge der Strukturfaktorquadrate nicht direkt die Position der einzelnen Atome innerhalb der Elementarzelle, sondern geben in Form von Vektoren über die Vektorlänge den interatomaren Abstand und der Vektorrichtung die Richtung an. Hierbei hängt die Peakintensität von der Elektronenanzahl der jeweiligen Atome ab, sodass die Intensitäten beziehungsweise die Vektoren der Schweratome hierüber bestimmt und somit die Position im Raum ermittelt werden kann¹⁵⁶. Mit Hilfe dieser ersten partiellen Strukturinformation kann dann wiederum die Position der verbleibenden Atome innerhalb der Elementarzelle berechnet werden¹⁵⁷.

Die PATTERSON-Funktion ist im Folgenden gezeigt.

$$P(u, v, w) = \frac{1}{V} \sum_{\substack{hkl \\ -\infty \\ +\infty}} |F_{hkl}|^2 \cdot \cos 2\pi[hu + kv + lw]$$

Innerhalb dieser Arbeit wurde der Lösungsansatz des Molekularen Ersatzes (*engl. molecular replacement*, MR) herangezogen um Proteinstrukturen von ScSun4-C Varianten zu lösen und anhand dessen ein Ligand-*screening* durchzuführen, sodass im Folgenden auf diesen Lösungsweg näher eingegangen werden soll.

Der molekulare Ersatz beschreibt eine Phasierungsmethode, bei der auf Phaseninformationen bereits bekannter Proteinstrukturen zurückgegriffen werden kann, sofern diese ähnliche Faltungsmuster aufweisen. Um jedoch von einem strukturellen Verwandtschaftsgrad zweier Proteine ausgehen zu können, sollte die Sequenzidentität auf Proteinebene > 30% betragen um eine erfolgreiche Lösung zu erhalten¹⁵⁸. Hilfreich in diesem Zusammenhang ist eine Vereinfachung der bekannten Struktur durch das Entfernen großer Schleifenbereiche, sodass für die eigentliche MR Berechnung eine kompakte Domäne ohne flexible Regionen herangezogen wird. Mit diesem Modell können MR-Programme wie MOLREP¹⁵⁹ innerhalb des CCP4-Pakets¹⁵⁵ oder PHASER¹⁶⁰ aus der PHENIX-Suite (*Python-based Hier-*

achical Environment for Integrated Xtallography) gestartet werden. Dabei beginnt eine sechsdimensionale Suche im Raum, die sich aus 3 Rotationsfreiheitsgraden und 3 Translationsfreiheitsgraden zusammensetzt, sodass sukzessiv Freiheitsgrade verändert werden um eine größtmöglicher Überlappung der berechneten PATTERSON-Karten zwischen bekannter Struktur A' und gesuchter Struktur A zu erhalten (Abbildung 24).

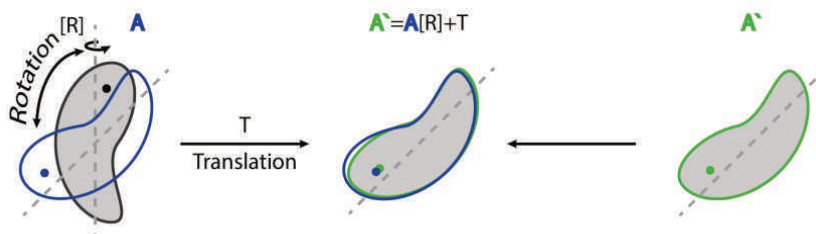


Abbildung 24: Vereinfachte Darstellung der benötigten Rotations- $[R]$ beziehungsweise Translationsoperationen T , für die größtmögliche Überlappung zwischen A (gesuchte Struktur) und A' (bekannte Struktur).

Nachdem die richtige Orientierung im Raum gefunden wurde, können anhand der bekannten Struktur, initiale Phasen berechnet werden, über die eine erste Elektronendichtekarte generiert werden kann. Die Qualität dieser Strukturlösung mittels molekularen Ersatzes wird in der *output-file* anhand mehrerer Statistischer Kenngrößen angegeben. Für eine erfolgreiche Strukturlösung sollten die unten aufgeführten Werte eingehalten werden.

TF Z-Score (<i>final Translation Function Z-score</i>)	> 8
LLG (<i>log-likelihood gain</i>)	Positiv + so hoch wie möglich
#Zusammenstöße	< 10

3.6.6 Verfeinerung der Strukturmodelle

Nachdem das Strukturmodell mit Hilfe des molekularen Ersatzes erhaltenen werden konnten, erfolgte ein manueller Einbau von Haupt- und Seitenketten in die zuvor berechnete Elektronendichte mittels *Coot*¹⁶¹. Daran knüpfte sich in *refmac5*¹⁶² ein Verfeinerungsschritt an, in dem das Proteinmodell anhand der *maximum-likelihood* Methode unter anderem Atomkoordinaten oder B-Faktoren gegen die experimentellen Daten der minimiert, um so ein Modell zu erhalten, dass die experimentellen Daten bestmöglich beschreibt. Die Berechnung des R-Werts ist durch folgende mathematische Beziehung beschrieben.

$$R = \frac{\sum |F_{obs}| - |F_{calc}|}{\sum |F_{obs}|}$$

Zusätzliche Aussagen können über die R-Faktoren (*reliability-factor*) R_{work} und R_{free} ausgegeben werden. R_{work} bezieht sich auf alle genutzten Reflexe während der Verfeinerung, wobei R_{free} nur Testreflexe beinhaltet, die innerhalb der Datenreduktion zurückgehalten wurden, circa 5% (maximal 2000 Reflexe) die nicht für die Strukturbestimmung herangezogen werden. Die Testreflexe werden für alle weiteren Datensätze einer Struktur weiter verwendet, vorausgesetzt die Raumgruppe hat sich nicht verändert.

3.7 Visualisierung und Illustration wissenschaftlicher Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurde bei den durchgeführten Experimenten eine große Menge an Daten generiert, die im Anschluss nach bestem Wissen und Gewissen weiter prozessiert wurden. Hierbei erfolgte die Auswertung je nach System sowohl über innerhalb der Software implementierte Evaluierungspakete als auch mit Hilfe von externen Programmen.

3.7.1 PyMOL

Die Geschichte der computergestützten Visualisierung von dreidimensionalen Proteinstrukturen beginnt in den frühen 1960ern am MIT (*Massachusetts Institute of Technology*) durch die Arbeit von LEVINTHAL¹⁶³ mit einem der ersten Modellbau-Programme. Die Darstellung der Drahtgitterstrukturen erfolgte auf einem schwarzweiß Oszilloskop, wobei der dreidimensionale Effekt durch eine ständige Rotation der Struktur erzeugt werden konnte. In den 80ern wurde von EVANS & SUTHERLAND ein kommerzielles System, mit *Frodo*¹⁶⁴ als Softwarepaket und farbiger Darstellung der Elektronendichte angeboten. Auf SAYL'S *RASMOL* (*raster molecules*) aus den 90ern, folgte Mitte der 2000er, ermöglicht durch die Computerrevolution, DELANO'S *open-source* Programm *PyMOL* zur Visualisierung von komplexen makromolekularen Systemen. Aufgrund der intuitiven grafischen Benutzeroberfläche ist *PyMOL*¹⁶⁵ bis heute eines der am häufigsten verwendeten Programme zur Strukturvisualisierung¹⁶⁶.

In dieser Arbeit erfolgte die grafische Aufarbeitung biomakromolekularer Strukturen vorrangig über *PyMOL* 1.6¹⁶⁵. Im Folgenden ist eine Auswahl an Befehlen zusammengestellt, die sowohl einzeln als auch via *PyMOL*-Skript (.pml) zur Erstellung von Abbildungen herangezogen wurden.

```
# Hintergrund weiß
bg white

# Hintergrund transparent
set ray_opaque_background, off

# Alles verbergen
hide all

# Cartoon-Darstellung
show cartoon

# Vereinfachte Schleifen
```

```

Set cartoon_smooth_loops, on
# Entferne Wasser, Heteroatome
remove resn HOH
remove resn HET

# Wechsel der internen Renderer (0 = Standard)
set ray_trace_mode, 3

# Farbe der Umrandung
set ray_trace_color, red

# 0 = aus, 2 = höhere Qualität
set antialias, 2

# Schatten aus=0 bzw. an=1
set ray_shadows, 0

# Tiefenschärfe aus=0 bzw. an=1
set ray_trace_fog, 0

# Perspektive aus=0 bzw. an=1
set orthoscopic, 0

# Abbildung rendern
ray 2040, 2040

# Abbildung exportieren
png /Ordner/Name.png

```

Weiterführende Literatur für den Umgang mit *PYTHON* basierten Skripten kann der *PyMOL*-wiki Webseite¹⁶⁷ entnommen werden.

Zusätzliche PyMOL Plugins oder Strukturelle Webserver

APBS (*Adaptive POISSON-BOLTZMANN Solver*) ist ein Softwarepaket mit eigenem *PyMOL*-Plugin für die Berechnung von elektrostatischen Interaktionen von Biomolekülen in wässriger Lösung durch Lösen der POISSON-BOLTZMANN Gleichung¹⁶⁸. Die Proteinstruktur wird hierbei durch mehrere Bearbeitungsschritte, wie dem Einstellen des Protonierungsgrades mittels *PROPKA*¹⁶⁹ oder der korrekten Zuweisung von Ladungszuständen, sowie der Wahl des geeigneten Kraftfeldes (*AMBER*¹⁰³, *CHARMM*) über den PDB2PQR-Server¹⁷⁰ in eine .pqr Datei umschrieben. Diese wird im Anschluss in *PyMOL* über das APBS-Plugin eingelesen und die elektrostatische Oberfläche erstellt.

CAVER3.0 ist ein Softwarepaket spezialisiert auf die Analyse und Visualisierung von Tunneln und Kanälen in Proteinstrukturen¹⁷¹.

Der **ConSurf-Server** ist ein bioinformatisches Tool für die Bestimmung der strukturellen Konservierung einzelner Aminosäuren innerhalb einer Proteinstruktur basierend auf phylogenetischen Beziehungen zwischen homologen Sequenzen. Dabei hängt der Grad der Konservierung (9 Stufen) jeder einzelnen Aminosäure stark von der strukturellen und funktionellen Bedeutung ab. Anhand einer Proteinstruktur werden 150 Homologe mittels BLAST¹⁷² zusammengetragen, ein phylogenetischer Baum über den *neighbor-joining* Algorithmus erstellt, daraus positionsspezifische Konservierungswerte anhand des *maximum-likelihood* Algorithmus berechnet und in neun diskrete Kategorien eingeteilt¹⁷³.

4. Ergebnisse

Das Reich der Pilze umspannt den gesamten Globus und besetzt mit seinen vielfältigen Vertretern immer wieder freiwerdende ökologische Nischen. Die damit einhergehende Variabilität stellte große Anforderungen an die pilzliche Zellwand. Dabei ist die pilzliche Zellwand die erste Kontaktstelle, wenn es um Interaktionen zu anderen Organismen oder dem Schutz vor widrigen Umwelteinflüssen geht. Aufgrund der hohen Schichtdicke der pilzlichen Zellwand, die je nach Organismus einige 100 µm betragen kann, und deren außerordentlichen Komplexität soll diese Arbeit bedeutende Fragen zur Zellwandmodellierung oder dem Eisentransport durch die Zellwand angehen. Die Grundlage hierfür stellen die Familien der SUN- und CFEM-Proteine. Beide Proteinfamilien werden aus dem Zellinneren nach außen sekretiert, sind innerhalb der pilzlichen Zellwand aufzufinden, erfüllen jedoch unterschiedliche Aufgaben. Die erste Proteinfamilie stellen SUN-Proteine, die bei der Zellwandmodellierung beteiligt sind, sodass eine Interaktion zu β -1,3-Glucanen aufgezeigt werden kann. Die zweite Proteinfamilie ist die Gruppe der CFEM-Proteine, die unter anderem bei der Eisenaufnahme sowie dem weiteren Transport des Eisens ins Zellinnere beteiligt sind.

4.1 SUN-Proteine

4.1.1 Phylogenetische Untersuchung von SUN-Proteinen

Aufgrund der hohen Anzahl an SUN-Proteinen erfolgte als erster Schritt eine phylogenetische Betrachtung um sich einen globalen Überblick über diese Proteinfamilie verschaffen zu können.

Die phylogenetische Untersuchung von SUN-Proteinen zeigt eine Aufspaltung in zwei Klassen, wobei die Position der SUN-Domäne je nach Gruppe entweder C-terminal oder mittig innerhalb der Proteinsequenz zu finden ist (Abbildung 25). Hierbei besteht die Klasse II aus Adg3-Orthologen, die neben einem verkürzten N-terminalen Serin/Threonin-reichen Bereich vor der Funktionsdomäne einen 50-120 Aminosäuren langen C-terminalen S/T-Einschub zeigen. Zusätzlich kann überwiegend in *Sordariomycetes* eine abschließende Transmembrandomäne gefunden werden. Diese C-terminale Transmembrandomäne besteht dabei nach Berechnungen anhand des *Phobius web server*¹⁷⁴ beispielsweise für Grg (Uniprot-ID: E3QA32), aus *Colletotrichum graminicola*, aus einer 18 Aminosäuren langen α -Helix. Die Subgruppen I und Ib unterscheiden sich lediglich in kleineren Einschüben oder Deletionen. Auffällig ist zudem, dass SUN-Proteine nur innerhalb des Phylums der Schlauchpilze (Ascomycota) vorkommen und sich Gruppe I vorrangig aus *Saccharomycetales* Vertretern zusammensetzt. Zusätzlich können innerhalb der Gruppe Ib organismenspezifische Gruppierungen beobachtet werden. Hier bilden *Sordariomycetes*, *Dothidiomycetes* und *Eurotiomycetes* abgegrenzte Gruppen. Dies

kann für Gruppe II nicht beobachtet werden. Zusätzlich kann keine spezifische Clusterbildung von pathogenen Organismen gezeigt werden.

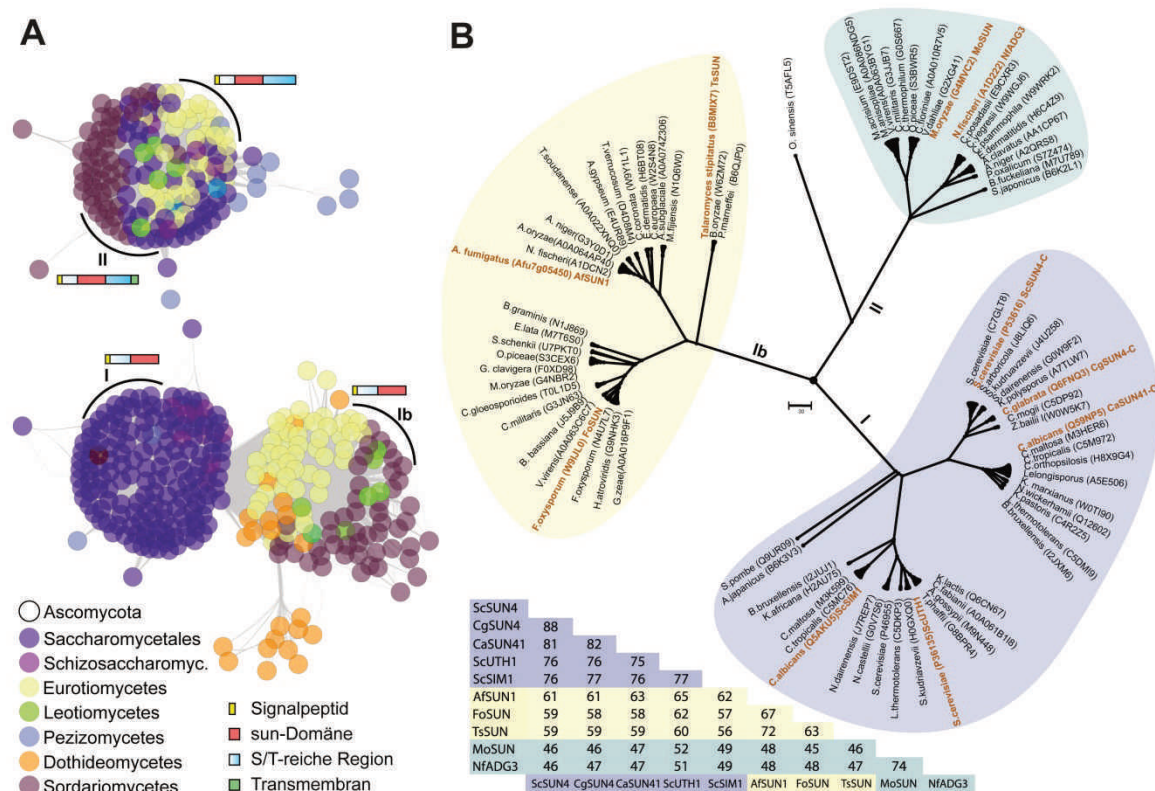


Abbildung 25: Phylogenetische Betrachtung von SUN-Proteinen sowie speziell der SUN-Domäne. A. EFI EST-SSN ($E\text{-value} = 5$, $\text{fraction} = 1$, domain off, $\text{alignment score} = 15$, Gruppierung $\geq 60\%$) der SUN-Familie anhand der Interpro Datenbank (IPR005556). Die Einfärbung erfolgte über die taxonomische Klasse. B. Phylogenetisches ML-Kladogramm für die SUN-Domäne mit der Analyse der Sequenzidentitäten ausgewählter Gruppenvertreter (rot).

Ein Blick auf die SUN-Funktionsdomäne zeigt in einem ML-Kladogramm, basierend auf einem *T-Coffee Alignment*, zwei Hauptgruppen, mit der Aufspaltung von Gruppe I weiter in Gruppe Ib, ähnlich dem EFI-EST-Netzwerk (Abbildung 25A). Die Sequenzidentitäten der SUN-Domänen liegen hier gruppenintern über 60 % und betragen gruppenübergreifend für I und II 45 -52 %.

Candida albicans und *Aspergillus fumigatus* verfügen als Humanpathogene über zwei SUN-Paraloge. *Saccharomyces cerevisiae* hingegen über fünf, wobei vier in Gruppe I (Sim1, P40472/221-463; Uth1, P36135/111-353; Nca3, P46955/83-325; Sun4, P53616/165-407) und ein Vertreter in Gruppe II (YMR244W, Q04018/46-304) zugeordnet werden kann (Tabelle 4.1.1).

Tabelle 4.1.1: Tabellarische Zusammenstellung einzelner Organismen und deren Anzahl an SUN-Paralogen.

Organismus / Stamm	Anzahl SUN-Paralogen
<i>Fusarium oxysporum</i> FGSC 9935	2
<i>Magnaporthe oryzae</i> FGSC 8958	2
<i>Cordyceps militaris</i> CM01	2
<i>Chaetomium thermophilum</i> DSM1495	2
<i>Candida albicans</i> SC5314	2
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288c	5

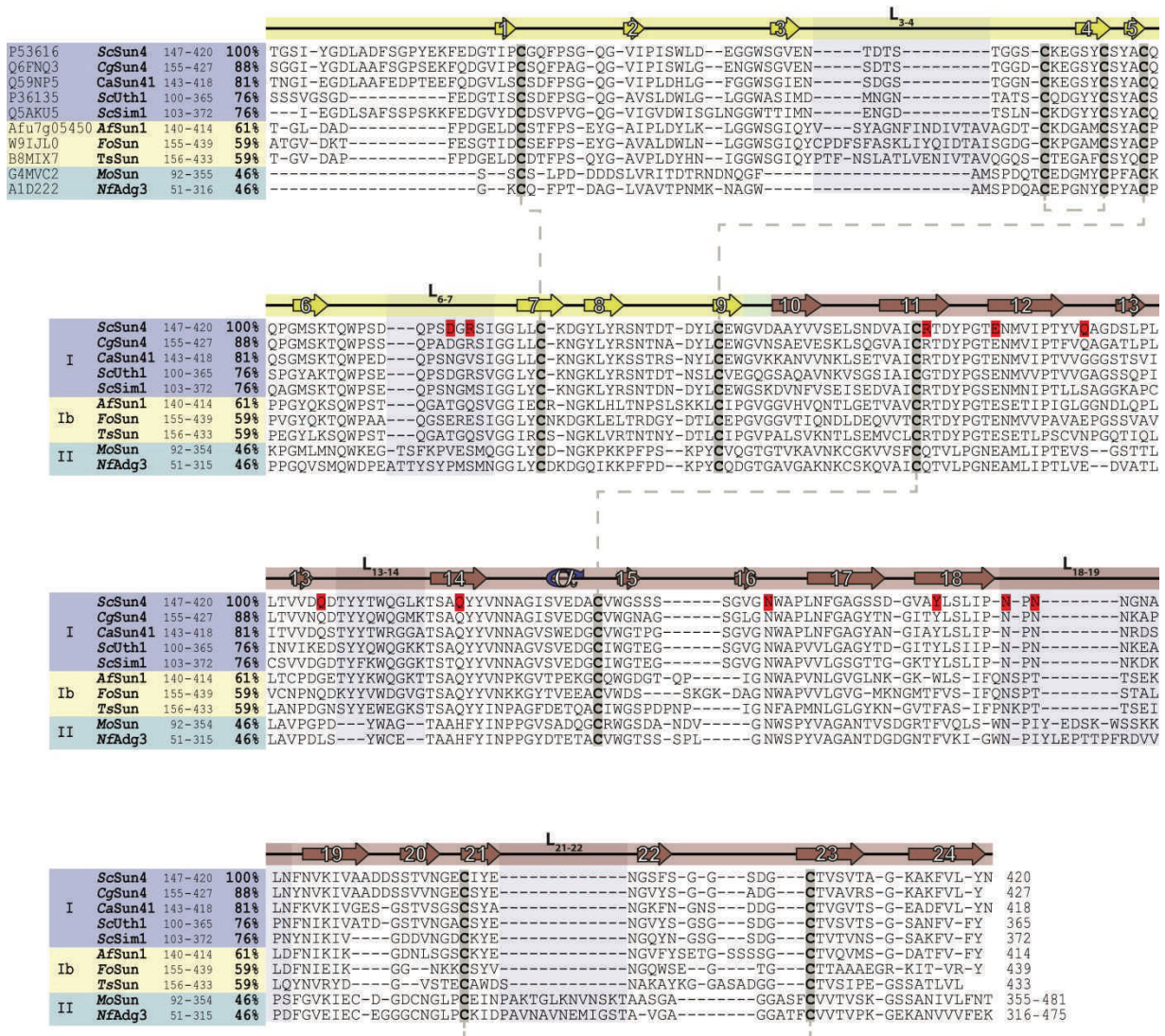


Abbildung 26: Multiples Sequenzalignment ausgewählter SUN-Domänen der Gruppen I, Ib und II aus der phylogenetischen Analyse. Uniprot-ID gefolgt von der organismenspezifischen Bezeichnung und dem für das Alignment verwendeten Sequenzbereich. Daran knüpft sich die ermittelte Sequenzidentität bezogen auf *ScSun4C*. Die Sequenzen sind farblich dem phylogenetischen Baum entsprechend gekennzeichnet (Abbildung 25B). Wichtige Bereiche sind hierbei farblich hervorgehoben: Disulfidbrücken und deren Cysteine (grau), Loopbereiche (hellgrau) sowie Positionen an denen Punktmutationen durchgeführt wurden (rot). Oberhalb der Sequenz befindet sich auf Grundlage der *ScSun4C*-Struktur die Darstellung der Sekundärstrukturelemente.

4.1.2 Molekularbiologie, Expression und Aufreinigung von SUN-Proteinen

Aufbauend auf der phylogenetischen Untersuchung der SUN-Domänen und deren Einteilung in zwei Gruppen, wurden einzelne Gruppenvertreter ausgewählt um darüber mögliche gruppenspezifische Eigenschaften näher charakterisieren zu können.

Die Domänenarchitektur von SUN-Proteinen beginnt N-terminal mit einem Signalpeptid an das eine Serin-/Threonin-reiche Region geringer Ordnung angeknüpft ist, worauf dann C-terminal eine SUN-Domäne folgt. Gruppe II-Vertreter zeigen hier zusätzlich nach der SUN-Domäne einen weiteren S/T-reichen Einschub. Abhängig vom Protein kann in einigen Fällen C-terminal eine Transmembranhelix bestehend aus 15-25 Aminosäuren beobachtet werden (Abbildung 27).

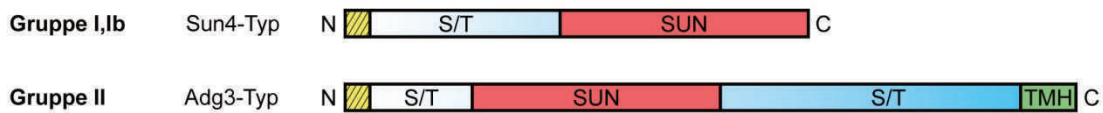


Abbildung 27: Schematische Darstellung beider Domänenorganisationen anhand der Phylogenieklassen I, Ib und II der untersuchten SUN-Proteine. N-terminal ausgehend beginnt eine Signalsequenz (gelb-gestrichelt), gefolgt von einem Serin/Threonin (S/T) reichen, repetitiven, ungeordneten Bereich (hellblau), der SUN-Domäne (rot), sowie einem aus 5-15 Aminosäuren bestehenden helikalen Transmembranbereich (TMH).

Der S/T-reiche Bereich zeigt lediglich eine geringe Komplexität, sodass für erste Arbeiten nur der Sequenzbereich um die SUN-Domäne für die Produktion rekombinanter Proteine ausgewählt wurde (Tabelle 4.1.2). Zudem wurden die Vollängenvarianten von *ScSun4* und *CaSun41* hergestellt. Die in dieser Arbeit hergestellten und weiter charakterisierten Proteine sind untenstehend aufgelistet.

Tabelle 4.1.2: Auflistung der hergestellten SUN-Proteine. Der Name setzt sich hierbei aus dem Kürzeln des Organismus (kursiv) und dem in der Uniprot hinterlegten Proteinnamen zusammen. Proteine die nur aus der C-terminalen SUN-Domäne bestehen tragen sind zusätzlich mit einem C gekennzeichnet.

	Organismus	Uniprot-ID	Sequenzbereich	Literatur
<i>AfSun1C</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i> CBS101355	Afu7g05450	149-414	60
<i>CaSun41</i>	<i>Candida albicans</i> SC5314	Q59NP5	24-418	45
<i>CaSun41C</i>	<i>Candida albicans</i> SC5314	Q59NP5	134-418	45
<i>CgSun41C</i>	<i>Candida glabrata</i> CBS138	Q6FNQ3	155-427	
<i>MoSunC</i>	<i>Magnaporthe oryzae</i> FGSC 8958	G4MVC2	92-405	
<i>ScSun4</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288c	P53616	23-420	45
<i>ScSun4C</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288c	P53616	147-420	
<i>ScSun4C</i>	R276L E283A Q318A Q318W Q318C Q292C Q304A N343L N365L, N367L R232L, D230L			

Die molekularbiologische Herstellung der Plasmide zur rekombinanten Expression von *ScSun4C*, *CaSun41C* und *CgSun4C* ist bereits in früheren Arbeiten durchgeführt worden^{87,89}. Für *MoSunC* und *AfSun1* wurden *E. coli* optimierte synthetische Gene von *Lifetechnologies* bezogen und über *NdeI*-, *XhoI* Schnittstellen in ein pET28a-Vektorsystem gebracht.

Die Produktion von rekombinanten SUN-Proteinen erfolgte hierbei in *E. coli* Shuffle T7 Express-Zellen nach einem Niedrigtemperaturprotokoll bei 12°C für 72 h⁸⁹. Nach der Zelllyse mittels French-Press oder einem Glaskugelhomoenisator (Fast-Prep-24™) und einer affinitätschromatographischen Ni-NTA-Aufreinigung über einen N-terminalen His-tag, erfolgte eine abschließende Größenausschlusschromatographie. Das hier eingesetzt sphärische Superdex 200 pg Material besteht aus hochgradig quervernetzter Agarose an die Dextran kovalent gebunden vorliegt. Die Retentionszeit für SUN-Proteine entspricht hierbei

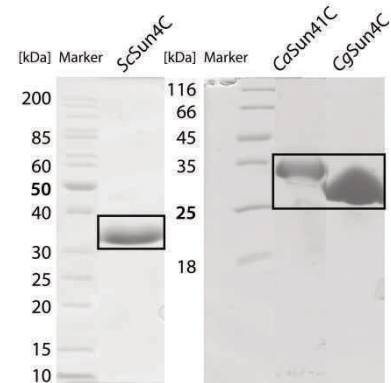


Abbildung 28: SDS-PAGE von *ScSun4C* (31.2 kDa), *CaSun41C* (31.0 kDa) und *CgSun4C* (31.0 kDa) nach der zweistufigen Aufreinigung bestehend aus Ni-NTA und Gelfiltrationschromatographie.

gemäß deren theoretischer monomeren Molekülmassen, sodass eine Interaktion zur vorrangig aus α -glykosidischen Bindungen aufgebauten Matrix nicht beobachtet werden konnte. Im Vergleich dazu zeigen das epitheliale Adhäsin Epa1¹¹⁹ aus *Candida albicans*, das Gal- β -1,3-Glc Strukturen bindet beziehungsweise das Chitinenden (N-Acetyl-1,4- β -D-Glukopyranosamin)-bindende Protein Ceal⁵ aus *Pichia pastoris*, eine starke Interaktion mit dem Säulenmaterial, was in einer deutlich längeren Retention resultiert.

Die Expressionsausbeuten der produzierten Proteine sind in folgender Tabelle zusammengetragen.

Tabelle 4.1.2: Expressionsausbeuten nach der vollständigen Aufreinigung der rekombinanten Proteine. Angabe in mg Protein pro Liter Kultur.

<i>CaSun4C</i>	6 mg/L _{Kultur}
<i>CgSun4C</i>	12 mg/L _{Kultur}
<i>ScSun4C</i>	15 mg/L _{Kultur}
<i>ScSun4C</i> _R276L	7 mg/L _{Kultur}
<i>ScSun4C</i> _E283A	12 mg/L _{Kultur}
<i>ScSun4C</i> _Q318A	20 mg/L _{Kultur}
<i>ScSun4C</i> _Q318W	21 mg/L _{Kultur}
<i>ScSun4C</i> _Q318C	13 mg/L _{Kultur}
<i>ScSun4C</i> _Q292C	15 mg/L _{Kultur}
<i>ScSun4C</i> _Q304A	15 mg/L _{Kultur}
<i>ScSun4C</i> _N343L	5 mg/L _{Kultur}
<i>ScSun4C</i> _N365L,N367L	4 mg/L _{Kultur}
<i>ScSun4C</i> _R232L,D230	5 mg/L _{Kultur}

Um einen möglichen Einfluss des N-terminalen S/T-reichen Bereichs auf die Funktion von der SUN-Domäne untersuchen zu können wurden zusätzlich verlängerte Konstrukte von *ScSun4*(23-420) und *CaSun41*(24-418) hergestellt. In breit angelegten Testexpressionen unterschiedlicher Bedingungen konnten beide Volllängenproteine nicht in löslicher Form überproduziert werden, sodass hier keine weiteren Ergebnisse vorliegen. Selbiges gilt für SUN-Domänen aus *Aspergillus fumigatus* (*AfSun1C*, Gruppe Ib) und aus *Magnaporthe oryzae* (*MoSunC*, Gruppe II), dem Erreger des Reisbrands, sodass auch hier keine weiteren Informationen zu Gruppe Ib und Gruppe II Vertretern gegenwärtig, gegeben werden können.

4.1.3 Kristallisation und Strukturlösung von *ScSun4C*-Varianten

Bereits in früheren Arbeiten konnte in der Arbeitsgruppe von Prof. Essen (Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Chemie) durch VEELDERS *et al.* eine hochaufgelöste Proteinstruktur von *ScSun4C* über SAD-Experimente erhalten werden⁸⁹.

Auf dieser nativen apo-Struktur aufbauend, konnten in dieser Arbeit innerhalb der Bedingung 75 der *JCSG-Core II* Suite, folgende Varianten erfolgreich kristallisiert werden. Tabelle 4.1.3 beinhaltet die statistischen Informationen zu den gelösten Proteinstrukturen.

Tabelle 4.1.3 : Datensammlung von *ScSun4C*-Varianten.

	<i>ScSun4C_E283A</i>	<i>ScSun4C_Q318A</i>	<i>ScSun4C_Q304A</i>
Röntgenquelle	MX14-1, BESSY II, Berlin	MX14-1, BESSY II, Berlin	ID14-4, ESRF Frankreich
Detektor	Pilatus 6M	Pilatus 6M	Pilatus 6M
Wellenlänge (Å)	0.91841	0.91841	0.86702
Raumgruppe	<i>I</i> 222	<i>I</i> 222	<i>I</i> 222
Zellmaße (Å) a,b,c	62.3, 99.1, 101.5	62.4, 99.2, 102.2	62.2, 99.8, 102.0
Auflösung (Å)	36.37 – 1.24 (1.30 – 1.24)	36.37 – 1.28 (1.35 - 1.28)	36.68 – 1.20 (1.26 – 1.20)
#Reflexe	4968065	5718938	873883
Multiplizität	6.2 (6.0)	6.7 (6.5)	8.5 (5.9)
#Reflexe _{einzigartig}	88813	81024	98997
<i>R</i> _{merge} (%)	4.9 (64.0)	4.9 (55.5)	6.0 (99.9)
Vollständigkeit (%)	99.8 (97.9)	100 (100)	99.9 (99.9)
Mittleres <i>I</i> / σ (<i>I</i>)	13.8 (2.7)	11.8 (3.1)	16.3 (2.0)
Mosaizität (°)	0.48	0.58	0.38
<i>R</i> _{factors} , <i>R</i> _{free} (%)	14.7, 17.2	16.0 – 19.0	15.2 – 17.7
Wilson B-Faktor (Å ²)	21.4	19.5	21.3

Ein zusätzliches Feinscreening wurde herangezogen um ausreichend Kristalle hoher Qualität für *soaking* Experimente zu gewinnen. Die folgende Abbildung zeigt den verwendeten Ansatz für die Bedingung 75 des JCSG Core II Suite.

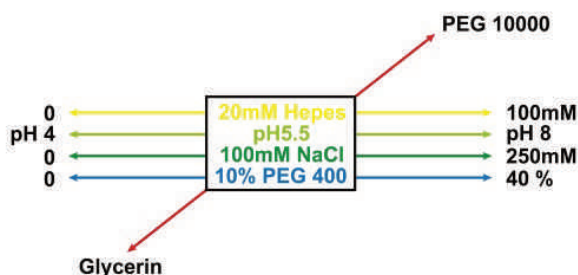


Abbildung 29: Feinscreening von *ScSun4C* ausgehend von Bedingung 75 der JCSG Core II Suite und der Variation von einzelnen Bestandteilen um die eigentliche Kristallisationsbedingung herum.

Für den Gruppe I Vertreter *CaSun41* aus *Candida albicans* und den Gruppe Ib Vertreter *AsSun1* aus *Aspergillus fumigatus* wurden laut LATGE *et al.* geringe Exoglukanase-Aktivitäten gegen β -1,3-Glucane beobachtet⁴⁵. Anhand dieser Erkenntnisse wurde ein Liganden-*screening* für *ScSun4C* sowie den Varianten E283 und Q318A durchgeführt. Hierbei sind neben Co-Kristallisationsexperimenten auch *soaking*-Ansätze mit β -1,3-Glucanen variierender Längen (*dense of polymerisation*, DP) bei unterschiedlichen Inkubationszeiten durchgeführt worden. Die Inkubationszeit der Proteinkristalle in der *soaking*-Lösung betrug 10 min, 30 min, 2 h sowie 24 h.

Tabelle 4.1.3: Verwendete Ligandenkonzentrationen für *soaking*-Ansätze. Die Konzentration von Laminarin bezieht sich auf eine Molmasse bei 4066 g/mol für DP25.

Glc	DP2	DP3	DP4	DP5	DP6	DP12	Laminarin
10mM- 1M	10- 50mM	10- 50mM	10- 50mM	10- 50mM	10- 50mM	~2mM	1- 20mM

Abschließend konnten 38 Proteinkristalle (VK023-VK061) vermessen werden (MX14-1, BessyII, Berlin). Die Auswertung der Datensätze ergab jedoch keine signifikante Zunahme bei der Differenzelektronendichte im Vergleich zur apo-Struktur. Es konnte weder um den Bereich der potentiellen Bindungstasche noch an anderen Positionen der Struktur zusätzliche Elektronendichte beobachtet werden.

4.1.4 Strukturelle Untersuchung der SUN-Domäne auf Basis von ScSun4C

Die Proteinstruktur der C-terminalen SUN-Domäne (G147-N420) aus *Saccharomyces cerevisiae* zeigt einen bilobalen Aufbau bestehend aus zwei strukturgebenden Domänen, die über einen kurzen aus vier Aminosäuren bestehenden Linker verbunden werden und ein Gesamtvolumen von $63 \times 99 \times 102 \text{ \AA}$ einnehmen. Die N-terminal flankierende Domäne (gelb) mit einem Molekulargewicht von 11 kDa wird durch neun β -Stränge (1-9) gebildet. Dabei ist eine Subtopologie in Form von konsekutiv antiparallel verlaufenden β -Strängen zu erkennen, die durch die β -Stränge 3-4 und 7-8 gebildet wird. Diese verfügen zudem über kurze *hairpin-loops* (L_{3-4} und L_{7-8}). Die Rigidität dieser strukturgebenden Einheit wird neben den Wasserstoffbrückenbindungen der antiparallelen β -Faltblätter zusätzlich über sechs Cysteine, die alle an Disulfidbindungen beteiligt sind, erreicht (Abbildung 30).

Die Kerndomäne (braun) von ScSun4C besteht aus sechs beziehungsweise sieben antiparallelen β -Faltblättern, die ein β -Sandwich ausbilden, wobei zusätzlich eine Disulfidbindung zwischen β_{21} - β_{23} die antiparallelen β -Faltblätter beider Lagen miteinander verbindet. Eine weitere Disulfidbindung stabilisiert die kleine α -Helix und damit auch den β -*hairpin* β_{15} - β_{16} .

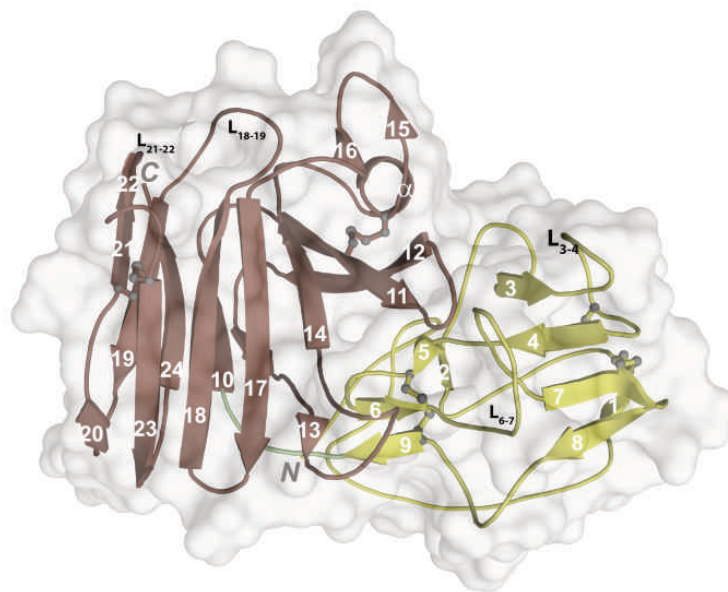


Abbildung 30: Proteinkristallstruktur der C-terminalen SUN-Domäne aus ScSun4C zeigt den bilobalen Aufbau, bestehend aus einem N-terminalen Sushi-artigen Faltungsmotiv (gelb) gefolgt von einem thaumatin-artigen Faltungsmotiv (braun).

Auf Grundlage des Faltungsmusters der N-terminalen Domäne (gelb) wurde eine Suche innerhalb der PDB nach Proteinen mit ähnlicher Faltung anhand des PDBeFOLD-Servers¹⁷⁵ durchgeführt. Hierbei zeigt sich eine große strukturelle Ähnlichkeit zu der alpha-Untereinheit des Interleukin 15 Rezeptors

(*Mus musculus*, Q60819, 2PSM:C). Der IL15-Rezeptor besteht aus den drei Untereinheiten IL15RA, IL15RB und γ_c . IL15RB und γ_c sind hierbei essentiell für die Signalweiterleitung und IL15RA für die hochaffine Bindung (30-100 pM) zum Interleukin 15 innerhalb des Reiches der *Metazoa* verantwortlich^{21,176}. Die Bindung erfolgt hierbei über ein hochkonserviertes Sushi-Bindungsmotif, auch CCP (*complement control protein*) oder SCR (*short consensus repeat*) genannt. Diese strukturelle Einheit deckt von ScSun4C 54 C α -Atome mit einem *rmsd* (*root mean square deviation*) von 2.57 Å ab, wobei sieben der acht β -Faltblätter der N-terminalen Sushi-Domäne gleich verlaufen. Lediglich der β -Strang β_3 ist innerhalb IL15RA nicht präsent (Abbildung 31). Anders als auf Strukturebene, zeigen auf Sequenzebene beide Domänen eine Identität von nur 9 %, was die bisher nicht vorhandene bioinformatische Annotation erklärt. Die bioinformatische Eingruppierung der Sushi-Domäne anhand der konservativen PFAM-Datenbank (PF00084) zeigt 25556 Sequenzen bei 972 unterschiedlichen Domänenarchitekturen (Stand 02.2017), die überwiegend im Reich der *Metazoa* vorkommen.

Bisherige Untersuchungen konnten das sekretierte Protein F4RL25 aus *Melampsora larici-populina*, dem Erreger des Pappelrosts, als einzigen pilzlichen Vertreter mit Sushi-Domäne ausfindig machen²⁰. Strukturelle Untersuchungen von Sushi/CCP/SCR Domänen als Bestandteil von pilzlichen Proteinen sind nach dem heutigen Wissensstand nicht bekannt.

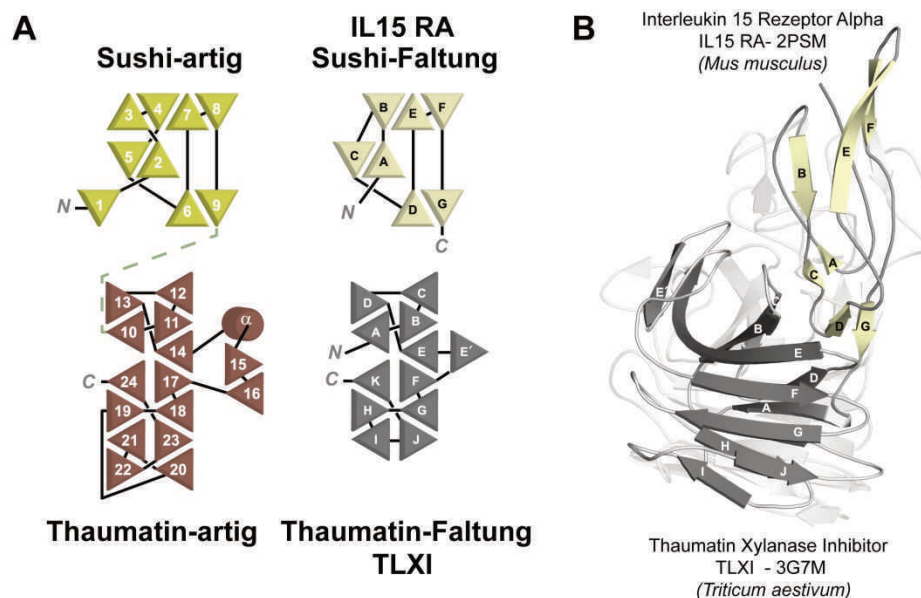


Abbildung 31: A. Topologiekarte der Sekundärstrukturelemente aus ScSun4C (Sushi, gelb; Thaumatin, braun) im direkten Vergleich zur strukturell verwandten Interleukin15-Rezeptor Alpha Domäne (IL15RA, 2PSM:C, hellgrau) sowie dem Thaumatin-Motiv des Xylanase Inhibitor (TLXI, 3G7M:A, grau). B. Strukturelles Alignment mittels PDBeFold von ScSun4C (hellgrau) mit TLXI und IL15RA und anschließender Überlagerung der Strukturen zur Verdeutlichung der strukturellen Ähnlichkeiten. TLXI überlagert mit einem *rmsd* von 2.64 Å für 120 C α -Atome mit der C-terminalen Domäne aus ScSun4C. Das Sushi-Motiv aus IL15RA superpositioniert für 54 C α -Atome bei einem *rmsd* von 2.57 Å auf den N-terminalen Bereich der SUN-Domäne.

Über eine strukturbasierte PDBeFold Suche nach einem bereits bekannten Faltungsmuster, dass das C-terminale β -Sandwich (braun) der SUN-Domäne strukturell beschreibt, konnte in der thaumatinartigen Faltung (*Thaumatococcus*-ähnliche Protein, TLP), zum Beispiel der Xylanase Inhibitor TLXI (Q0WX48, 3G7M) aus Weichweizen (*Triticum aestivum*), gefunden werden. Diese Kongruenz zeigt sich in 120 überlagerten C_{α} -Atomen bei einem *rmsd* von 2.64 Å sowie einer Sequenzidentität von lediglich 15 %. Neben der geringen Sequenzidentität ist auch das unter den Thaumatinen hochkonservierte REDDD-Motiv im Zentrum des β -Sandwich in der SUN-Domäne nicht vorhanden, sodass die Nähe zur thaumatinartigen Faltung nur von struktureller Natur ist.

Innerhalb der beiden Lagen des β -Sandwich, das durch die β -Stränge der oberen Schicht (β_{12} , β_{11} , β_{14} , β_{17} , β_{18} , β_{23} , β_{20}) und der unteren Schicht (β_{13} , β_{10} , β_{24} , β_{19} , β_{21} , β_{22}) gebildet wird, findet ein *loop crossing* beider Lagen statt, sodass ein Teil der Haupt- und Seitenketten im Inneren sterisch eingeschlossen werden. Daraus ergibt sich für diesen Bereich eine Desolvatation und damit einhergehende Reduktion von Wasserstoffbrückenbindungen, wobei jedoch ein kompakterer und sehr stabiler hydrophober Kernbereich erzeugt wird¹⁶.

Alle zehn Cysteine der SUN-Domäne sind an Disulfidbindungen beteiligt und folglich nicht als Nukleophile verfügbar, sodass das der von CAMOUGRAND *et al.* postulierte Cystein-Cluster (Cys-X₅-Cys-X₃-Cys-X₂₄-Cys) innerhalb der Sushi-Einheit nicht an der Bindung an einen Eisen-Schwefel-Cluster beteiligt sein kann¹⁷⁷.

Besonders charakteristisch für alle TLPs und damit auch ScSun4C ist die Furche, die über die Loopregionen strukturell aufgebaut wird und überwiegend aus sauren Seitenketten besteht (Abbildung 32A, roter Bereich). Dabei bildet die obere Lage des β -Sandwich, der thaumatinartigen Domäne, über den β -Strängen β_{12} , β_{11} , β_{14} , β_{17} , β_{18} , β_{23} , β_{20} die Basis der Furche, wobei die Loopregionen L₁₈₋₁₉, L₂₁₋₂₂ und L₃₋₄, L₆₋₇, L₁₃₋₁₄ diesen Bereich von beiden Seiten her flankieren. Um einen strukturellen Vergleich mit den Gruppe Ib- und Gruppe II-Vertretern, der phylogenetischen Untersuchung von SUN-Proteinen durchzuführen, wurden mittels I-Tasser¹⁷⁸ Homologiemodelle für die SUN-Domäne von AfSun1 und MoSun erstellt. Die Überlagerung dieser Modelle zeigt erwartungsgemäß eine hohe strukturelle Ähnlichkeit. Unterschiede zeigen sich jedoch in gruppenspezifischen Einschüben innerhalb der Loopbereiche. MoSun (Gruppe II) zeigt starke Loopverlängerungen in L₁₈₋₁₉ und L₂₁₋₂₂, AfSun1 (Gruppe Ib) trägt einen 14 Aminosäuren-Einschub in L₃₋₄. ScSun4. Da die Loopbereiche den oberen Bereich der Furche definieren, bedingen Looperweiterungen für den Fall eines starren Loops eine Verringerung Innenvolumens der Furche. Für den Fall von dynamischen/flexiblen Loops würde eine größere Kontaktfläche zum gebundenen Liganden entstehen (Abbildung 32). Letzteres Modell kann durch eine schraubzwingenartige Funktionsweise bildlich beschrieben werden.

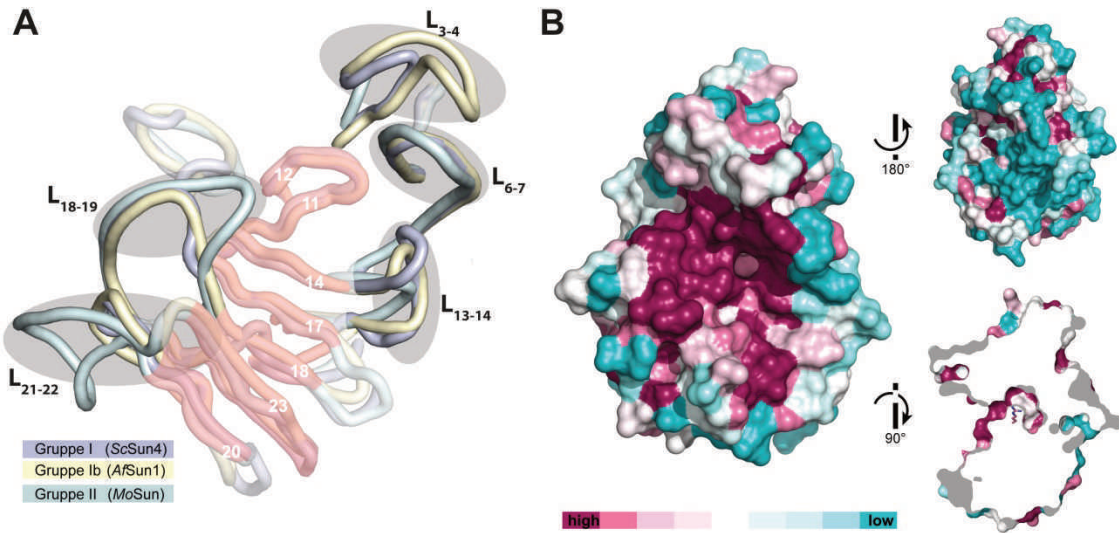


Abbildung 32: A. Auf Basis von *ScSun4C* wurden mittels I-Tasser¹⁷⁸ für *AfSun1* (Afu7g05450, gelb, Gruppe Ib) und *MoSun* (G4MVC2, mintgrün, Gruppe II) Proteinstrukturberechnungen durchgeführt. Niedrige *C-scores* von -1.62 für *AfSun1* und -1.55 für *MoSun* verdeutlichen die hohe Qualität der berechneten Modelle. B. Die evolutionäre Konservierung innerhalb der SUN-Domäne wird hier grafisch mit Hilfe einer Strukturüberlagerung aufgezeigt. Die Berechnungen erfolgten via ConSurfServer¹⁷³, UNIREF90 100 Homologe, CSI-BLAST¹⁷² *E-value* -5, Max-ID 90%, Homologe-ID 35%. Der Grad der Konservierung wird in rot (hoch) - weiß – blau (niedrig) angezeigt.

Der hohen Flexibilität auf Loopebene steht ein hochkonservierter Furcheninnenbereich entgegen. Das ergibt eine ConSurfServer¹⁷³ Berechnung, die die evolutionäre Konservierung der Aminosäuren auf Basis eines CSI-BLAST¹⁷² für 100 homologen Sequenzen (UNIREF90) erstellt und diese mittels Strukturüberlagerung grafisch anhand der *ScSun4C* Struktur aufzeigt. Ein Querschnitt durch die Struktur zeigt zudem einen schraubenförmigen Tunnel durch die SUN-Domäne hindurch, der selbst noch im Inneren eine signifikant hohe Konservierung aufweist und damit die evolutionäre Bedeutung in Bezug auf die Funktion auf Aminosäurelevel aufzeigt. Der Durchmesser des Tunnels bietet im konservierten Bereich ausreichend Platz für eine Kette aus vier Hexosen. Bei einem vollständig ausgebildeten Kanal, nach geringfügigen konformationellen Änderungen, könnte eine Kette bestehend aus sechs Hexosen die gesamte Struktur tunneln. Dies könnte ein Hinweis auf eine zweite Bindungstasche sein, wodurch eine Erkennung von verzweigten Strukturen ermöglicht wird.

4.1.5 Funktionelle Untersuchung von SUN-Domänen

Das in *E. coli* produzierte rekombinante Protein wurde nach seiner zweistufigen Aufreinigung mittels Alexa Fluor®488 markiert und einer Hochdurchsatz-Ligandensuche, einem *glycan array screening*, am *Consortium for functional glycomics* (CFG, Atlanta, GA) unterzogen. Die Resultate für die 611 unterschiedlichen Zuckerstrukturen des V5.1 Pathogen-Chips zeigen selbst nach wiederholter Messung für ScSun4C keine Bindung an die präsentierten Glykanstrukturen (Anhang 7.1). Hier muss jedoch berücksichtigt werden, dass unter den präsentierten Strukturen weder β -1,6-Glucane noch β -1,3-Glucane aufgebracht sind, da die Zielgruppe dieses Konsortiums vorrangig C-Typ Lektine /Galektine von Pathogenen sind. Auf Grundlage der beschriebenen Interaktion von AfSun1 und CaSun41 zu β -1,3-Glucanen nach LATGE *et al.* wurde rekombinantes ScSun4C und CaSun41C auf deren enzymatische Funktion gegen β -1,3-Glukan DP12 untersucht^{45,60}. Diese zeigen im Gegensatz zum heterolog in *P. pastoris* produzierten AfSun1 Volllängenprotein keine Exoglukosidase-Aktivität, da über den gesamten Messzeitraum von 24 h keine Spaltung des eingesetzten β -Glukans beobachtet werden kann. Für AfSun1 als Positivkontrolle erfolgt eine langsame Hydrolyse bis hin zur monomeren Glukose, wobei die träge Reaktion nicht vollständig abläuft und ein großer prozentualer Anteil an Zwischenprodukten verbleibt.

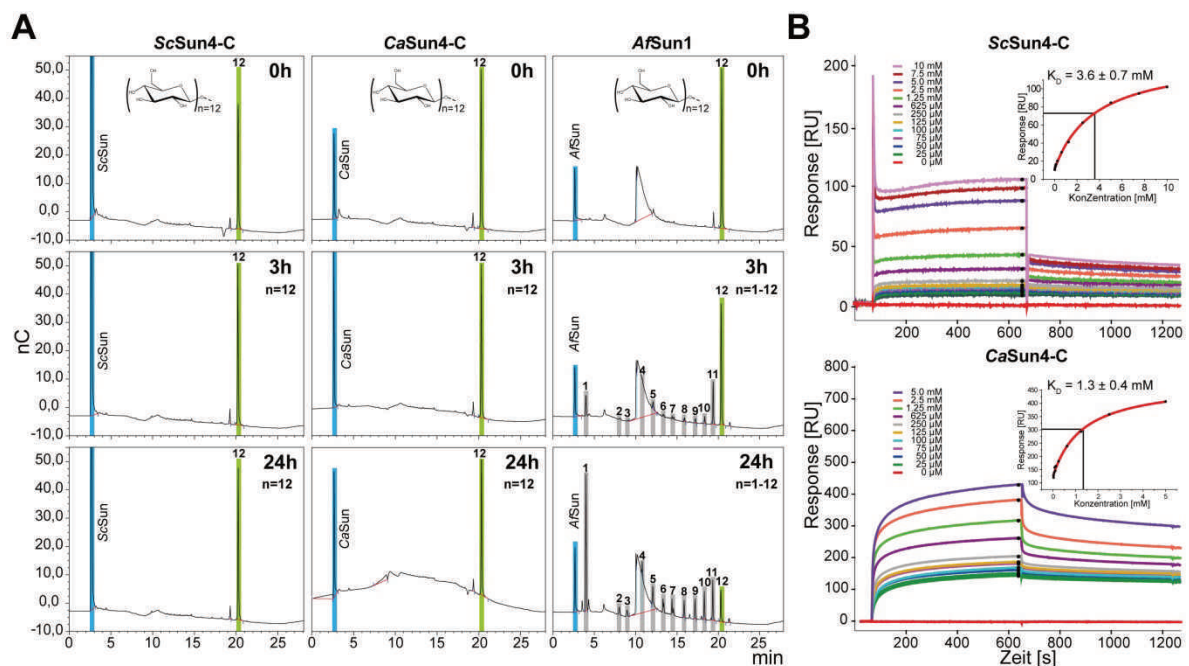


Abbildung 33: HPLC-Funktionsuntersuchung von SUN-Proteinen aus *S. cerevisiae* (ScSun4C, P53616, 147-420), *C. albicans* (CaSun41C, Q59NP5, 143-418) und *A. fumigatus* (AfSun1, Afu7g05450, 23-414) und deren zeitaufgelöste Hydrolyseaktivität für β -1,3-Glukanstrukturen (DP12). B. Interaktionsuntersuchung von ScSun4C und CaSun4C für Laminarin (*Carbosynth*) mittels Oberflächenplasmonresonanz (SPR) mit Angabe der Bindungskonstanten unter der Annahme $M_{\text{Laminarin}} = 4066$ Da.

Trotz der nicht vorhandenen enzymatischen Funktion erfolgte eine Bindungsuntersuchung mittels Oberflächenplasmonresonanz, wobei die SUN-Domänen aus *S. cerevisiae* und *C. albicans* auf einem CM5-Chip immobilisiert wurden und im Anschluss daran wasserlösliches Laminarin über die Flusszelle gegeben wurde¹⁷. Laminarin (*Dextra*) ist ein Zellwandextrakt des Fingertangs, einer Braunalge (*Laminaria digitata*), und besteht aus linear verknüpften β -1,3-glycosidisch Glukoseeinheiten, die wiederum sporadisch β -1,6-glycosidisch [7:1] verbrückt sind. Bedingt durch die Extraktionsmethode lässt sich der Polymerisationsgrad, da es sich um ein Gemisch handelt, bestenfalls über eine Gauß-Verteilung um DP25 ($M_{\text{Laminarin}} = 4066 \text{ g/mol}$) herum beschreiben^{37,179}.

Für Laminarin konnte eine deutliche Bindung für beide SUN-Proteine gezeigt werden, mit einer Bindungskonstante, unter der Annahme eines monomeren DP25-Liganden, im millimolaren Bereich. Darauf aufbauend wurden Varianten von *ScSun4C* hergestellt, die die potentielle Bindungstasche innerhalb der Furche sterisch oder durch Ladungsumkehr derartig verändern, sodass die Bindung zu Laminarin inhibiert wird. Darüber hinaus sind Cystein-Varianten erstellt worden, die mittels Fluorescein-5-Maleimid markiert wurden und deren Einfluss auf Bindung hin anschließend untersucht wurde (Abbildung 34).

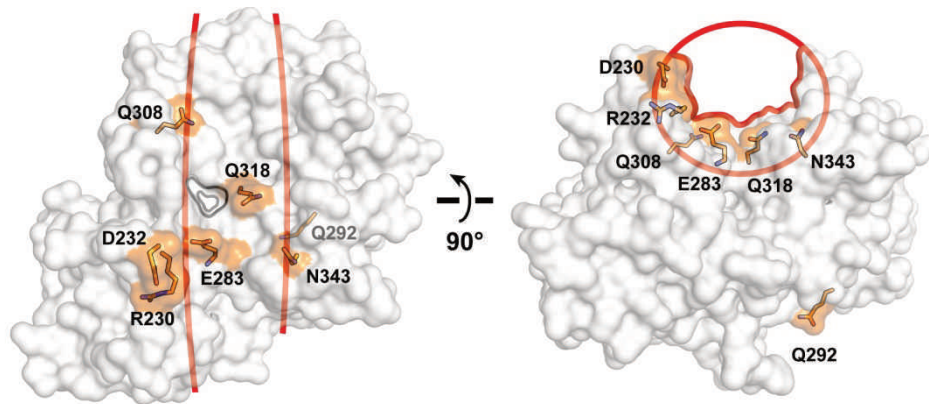


Abbildung 34: Schematische Darstellung der *ScSun4C*-Varianten Q308A, Q318W/A/C, E283A, R230L-D232L, N343L, Q292C in orange hervorgehoben. Der rote Bereich umschließt die polare Furche.

In der folgenden Tabelle sind die Bindungsergebnisse anhand der Bindungskonstante K_D und R_{max} tabellarisch zusammengestellt (SPR-Sensogramme befinden sich im Anhang). R_{max} gibt hierbei die Bindungskapazität (Aktivität) der Oberfläche, über folgende Beziehung an:

$$R_{\text{max}} = \frac{\text{Analyt}_{\text{MW}}}{\text{Ligand}_{\text{MW}}} \cdot R_L \cdot S_m$$

R_L : Immobilisierungslevel, S_m : Stöchiometrisches Bindungsverhältnis

Die gemessene Bindungskapazität für Laminarin von *CaSun4C* ist im Vergleich zu *ScSun4* deutlich höher, was sich in einem um den Faktor 3 größeren R_{\max} -Wert widerspiegelt (Tabelle 4.1.5). Für die Cystein-Variante *ScSun4C-318C*, die innerhalb der potentiellen Bindungsstelle liegt, kann zwar ein Bindungsverlauf (Sensogramme siehe Anhang 7.4), jedoch keine Absättigung beobachtet werden, sodass keine Bindungskinetik errechnet werden kann. Die chemische Fluorescein Modifikation von *ScSun4C-Q318C-F* zeigt eine Reduktion um die Hälfte der Bindungskapazität für Laminarin, sodass der zusätzliche sterische Einfluss des Fluorescein die Bindung an Laminarin vermindert. Die Variante *ScSun4C-Q292C*, die das Cystein auf dem Loop₁₂₋₁₃ trägt, zeigt eine leicht erhöhte Aktivität gegen Laminarin, jedoch erfolgt nach Fluoresceinmarkierung des Cysteins eine Reduktion der Bindungsaktivität um den Faktor vier im Vergleich mit *ScSun4C*. Für weitere Varianten, die inmitten der sauren Furche liegen (E283A, Q308A, Q318W, Q318A) als auch an den Loopregionen um die potentielle Bindungsstelle herum (N343L, R230L/D232L) konnte keine signifikante Veränderung für die Bindungsaktivität der jeweiligen Proteine erhalten werden (Tabelle 4.1.5).

Tabelle 4.1.5: Dissoziationskonstanten für die Interaktion von SUN-Proteinen an Laminarin, auf Grundlage von Oberflächenplasmonresonanzmessungen.

	K_D /mM	R_{\max} /RU
<i>CaSun4C</i>	1.32 ± 0.4	356.2
<i>ScSun4C</i>	3.57 ± 0.7	124.2
<i>ScSun4C-Q318C</i>	-	-
<i>ScSun4C-Q318C-F</i>	4.69 ± 0.56	57.7
<i>ScSun4C-Q292C</i>	3.32 ± 0.15	151.1
<i>ScSun4C-Q292C-F</i>	2.43 ± 0.19	36.6
<i>ScSun4C-Q318W</i>	1.52 ± 0.20	114.9
<i>ScSun4C-E283A</i>	1.07 ± 0.07	99.9
<i>ScSun4C-N343L</i>	1.39 ± 0.15	98.1
<i>ScSun4C-Q308A</i>	0.79 ± 0.07	79.7
<i>ScSun4C-Q318A</i>	2.67 ± 0.33	143.5
<i>ScSun4C-R230L/D232L</i>	0.65 ± 0.26	93.8

Im Gegensatz zu den SPR-Resultaten zeigen die Bindungsmessungen für *ScSun4C* und *CaSun41C* bezüglich Laminarin mittels isothermaler Titrationskalorimetrie keine auswertbaren Sensogramme (Abbildung 35). Dies kann jedoch auch bei anderen glykanbindenden Proteinen wie beispielsweise Flo2 aus *S. cerevisiae* beobachtet werden¹⁸⁰. Eine Erklärung hierfür kann ein nur geringer enthalpischer Bindungsbeitrag ΔH sein¹⁸¹. Zudem sollte die eingesetzte Ligandenkonzentration in weiteren Messungen höher gewählt, das Protein in die Spritze und die Laminarinlösung in die Messzelle gegeben werden.

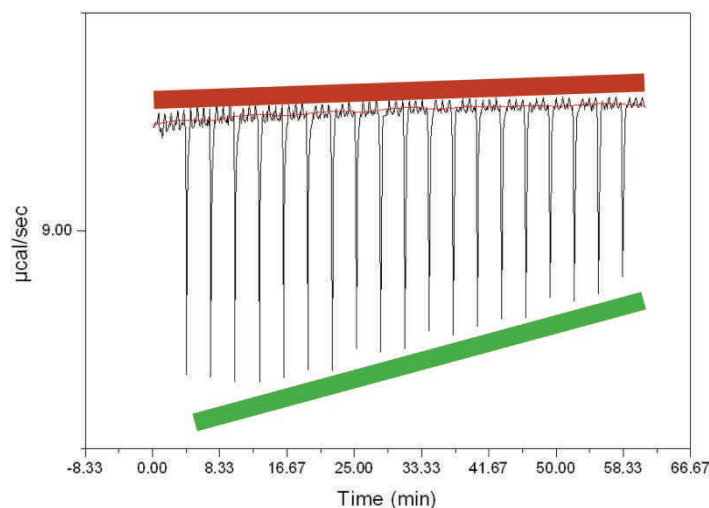


Abbildung 35: ITC-Sensorgram für die Messung von 100 μM *CaSun41C* mit 4 mM Laminarin ($M_{\text{Laminarin}} = 4066 \text{ g/mol}$) bei 10 °C. Der rote Balken gibt die Baseline an und der grüne Balken die Reduktion der Bindungsisothermen.

4.1.6 HDX-MS Analytik von *ScSun4C*

Um die vorangegangenen Erkenntnisse mit zusätzlichen Ergebnissen zu untermauern und zusätzlich einen Überblick zum strukturellen Verhalten von *ScSun4C* in Lösung zu erhalten, wurden Wasserstoff-Deuterium Austauschreaktionen (HD/X-MS) unter Leitung von ANDREAS MIELCAREK und UWE LINNE (Phillips-Universität Marburg, FB Chemie, Abteilung Massenspektrometrie) durchgeführt. Hierfür wurde rekombinantes *ScSun4C* (50 μM), nach einer zweistufigen Aufreinigung, 15 s, 30 s, 60 s, 120 s und 300 s in D_2O -Puffer inkubiert und nach einem Pepsinverdau die Massenzunahme der zugeordneten Peptide ausgewertet. Dabei wurde zusätzlich der Einfluss von Laminarin auf die Deuteriumaustauschraten untersucht um potentielle Bindungsstellen genauer eingrenzen zu können. Darüber hinaus sind die Messungen bei pH 5.5, dem potentiellen Aktivitätsmaximum⁴⁵, und bei pH 8.0 durchgeführt worden. Hieraus können Rückschlüsse zu strukturellen Umlagerungen bei wechselnden pH sowie eine pH-Abhängigkeit der Bindung zu β -1,3-Glukanen erhalten werden.

Die Überlagerung, der HDX-Austauschraten (pH 5.5) bei 15 s Deuterierung, auf die Proteinstruktur von *ScSun4C* zeigt eine starke Deuteriumaufnahme für die obere Lage der thaumatin-Domäne, wobei die β -Faltblätter $\beta_{12}, \beta_{11}, \beta_{14}$ und Loop L_{13-14} mit bis zu 50 % Deuteriumaufnahme dominant hervorstechen. Zusätzlich zeigt der His-tag des rekombinanten Proteins wie erwartet einen hohen Deuteriumaustausch, da dieser N-terminal frei vorliegt und keine direkten Sekundärstrukturelemente ausbildet. Ein Schnitt entlang der Domänengrenze zwischen Thaumatin- und Sushi-Domäne zeigt für die Interaktionsfläche beider Domänen einen nur geringen Deuteriumaustausch. Dies spiegelt eine feste Domänenassoziation in Lösung wieder.

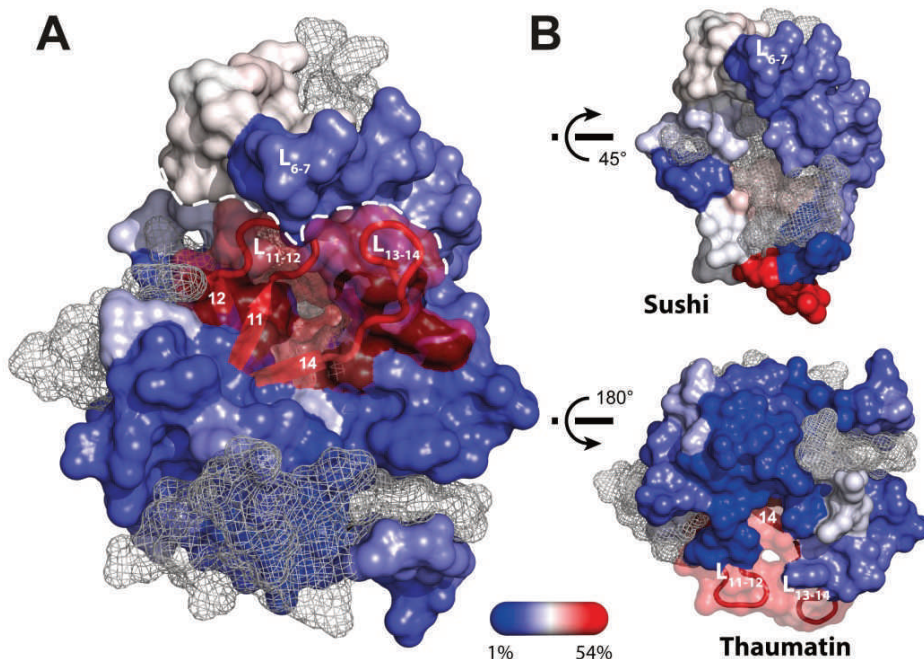


Abbildung 36: A) HDX-MS Untersuchung von *ScSun4C* (15s Inkubation in D_2O Acetat-Puffer pH5.5) in blau-weiß-rot (gering bis stark) zeigt die Austauschraten der Amid-Protonen. B) Die Grenzfläche zwischen Sushi und Thaumatin-Domäne ist in weiß-gestrichelter Linie gekennzeichnet, sowie die Interaktionsfläche innerhalb beider Domänen.

Ein Vergleich zwischen pH 5.5 und pH 8.0 HDX-Ergebnissen zeigt vom N-Terminus ausgehend bis hin zu $\beta 1$, für den *His-tag* eine starke Deuteriuminkorporation, was einer flexiblen und freiliegenden Struktur entspricht. Aufgrund der pH-Abhängigkeit der Austauschreaktion können für pH 5.5 im Vergleich zu pH 8.0 deutlich geringere Deuteriumaustauschraten beobachtet werden. Weiterhin ist für die β -Faltblätter β_{12} , β_{13} , $\beta_{13'}$ und β_{14} innerhalb der Thaumatin-Domäne von *ScSun4C*, nur bei pH 5.5 ein starker Austausch zu beobachten, was sehr interessant ist, da β_{12} die obere und β_{13} die untere Lage dieser Domäne bildet. Da der Austausch innerhalb beider Lagen der Thaumatin-Domäne zunimmt könnte hier eine größere Strukturelle Umlagerung stattfinden, was einer späteren Diskussion bedarf.

Für einen globalen Überblick eignet sich die Heatmap-Darstellung der gemessenen HD/X-MS Austauschraten, jedoch gehen kleine Differenzen innerhalb der apo und holo-Messungen hier leicht unter, sodass für die Betrachtung einer signifikanten Änderung bei Bindung zu Laminarin, wiederum auf die Peptidliste zurückgegriffen werden muss. Unterschiede zwischen apo- und holo-*ScSun4C* in folgender Abbildung sind in schwarzen Kästen I*, II*, III*, IV* und V* hervorgehoben und befinden sich um die Loopregionen L_{3-4} (I*) und L_{6-7} (II*) innerhalb der Sushi-Domäne sowie bei β_{12}, β_{13} (III*), L_{13-14} , β_{14} (IV*) und β_{18} , L_{18-19} (V*) innerhalb der Thaumatin-Domäne liegen. All diese Bereiche sind entweder Bestandteil oder stehen in unmittelbarer Nähe zur polaren Furche.

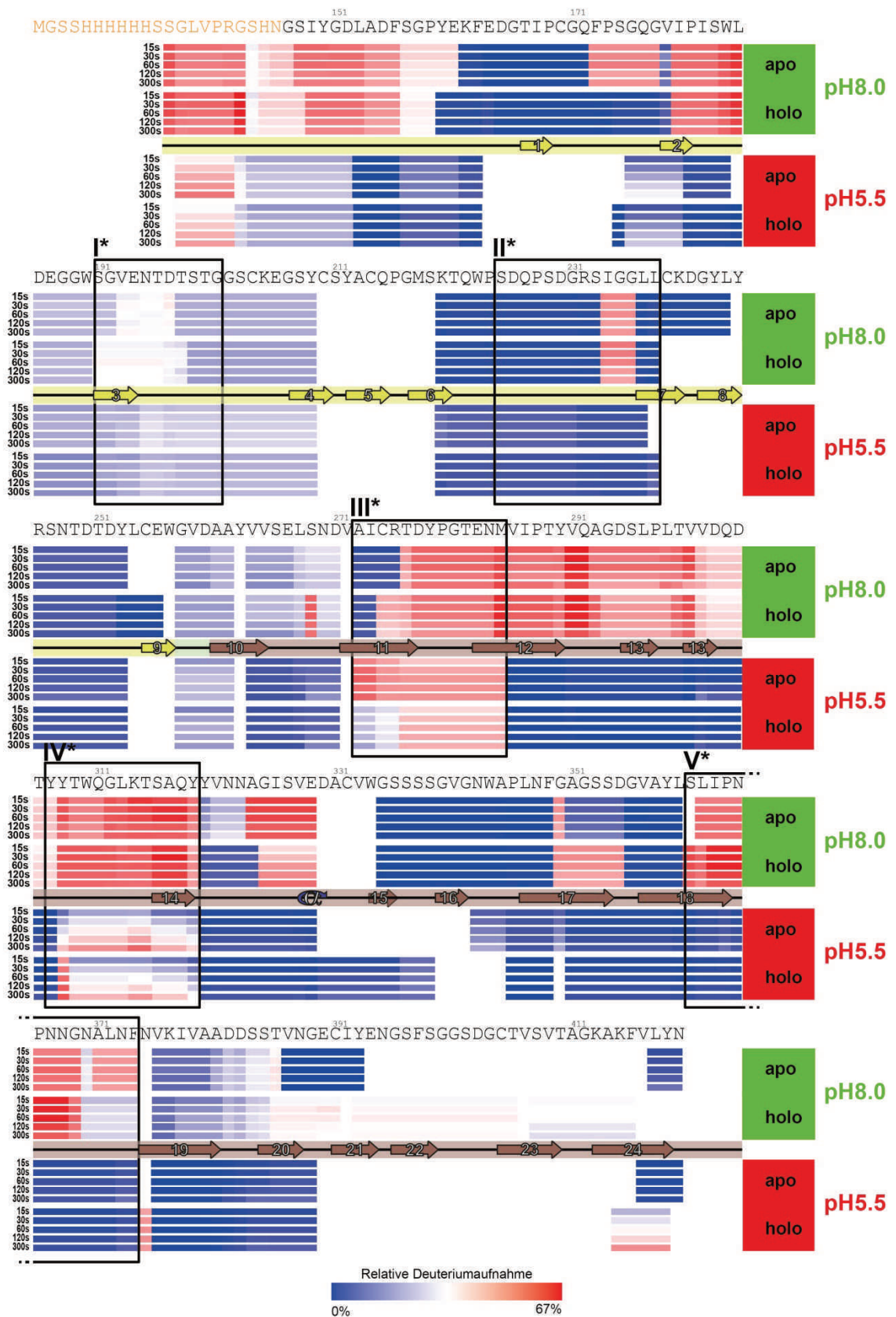


Abbildung 37: HDX-MS Untersuchung von *ScSun4C* bei pH 8.0 (10 mM Tris) grün und pH 5.5 (50 mM Acetat) rot, ohne (apo) und mit Zugabe (holo) von 5 mM Laminarin (*Carbosynth*, $M_{\text{Laminarin}}=4066$ g/mol). Die Deuterierungsreaktion wurde für 15 s, 30 s, 60 s, 120 s, und 300 s verfolgt. Die relative Deuteriumaufnahme ist in blau-weiß-rot Darstellung gezeigt. Der His-tag ist in orange vorgehoben. Sekundärstrukturelemente und die Sushi- (gelb) sowie Thaumatin-Domäne (braun). Schwarze Kästen mit I*-V* geben wichtige Bereiche an.

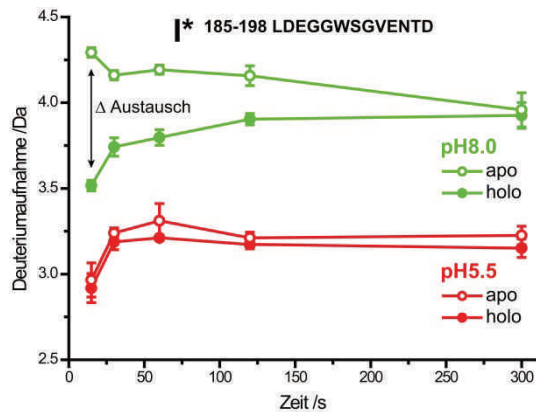


Abbildung 38: Zeitlicher Verlauf der Deuteriumaufnahme des Peptids 185-198 ohne (apo) und mit (holo) Laminarinzugabe sowie der exemplarische Ermittlung der Differenzaustauschrate (holo - apo).

Die Kartierung der Interaktionsfläche von *ScSun4C* und Laminarin erfolgte durch Messungen bei pH 5.5 (50 mM Acetat) sowie bei pH 8.0 (10 mM Tris), wobei die Auswertung der Peptidlisten für apo- und holo-*ScSun4C* getrennt voneinander durchgeführt wurde, sodass für den Vergleich untereinander zuerst in DynamX die Peptidlisten als clusterdata exportiert und dann mittels Origin8.0 (OriginLab, Northampton, MA) ausgewertet werden musste. Hierbei zeigte sich die größte Differenzaustauschrate für die kürzesten Messpunkte bei 15 s.

In folgender Abbildung sind die Differenz-Austauschraten (holo - apo) für ausgewählte Peptide, die in beiden Peptidlisten vorkommen, nach 15 s Deuterierung für pH 5.5 und pH 8.0 aufgeführt. Die Differenzaustauschraten spiegeln die Austauschraten im Großen und Ganzen wieder, sodass bei pH 8.0, starke Abnahmen für holo - apo, innerhalb der Bereiche I* (185-194, L₃₋₄), IV* (307-320, L₁₃₋₁₄ und β₁₄) und V* (361-375, L₁₈₋₁₉) beobachtet werden können.

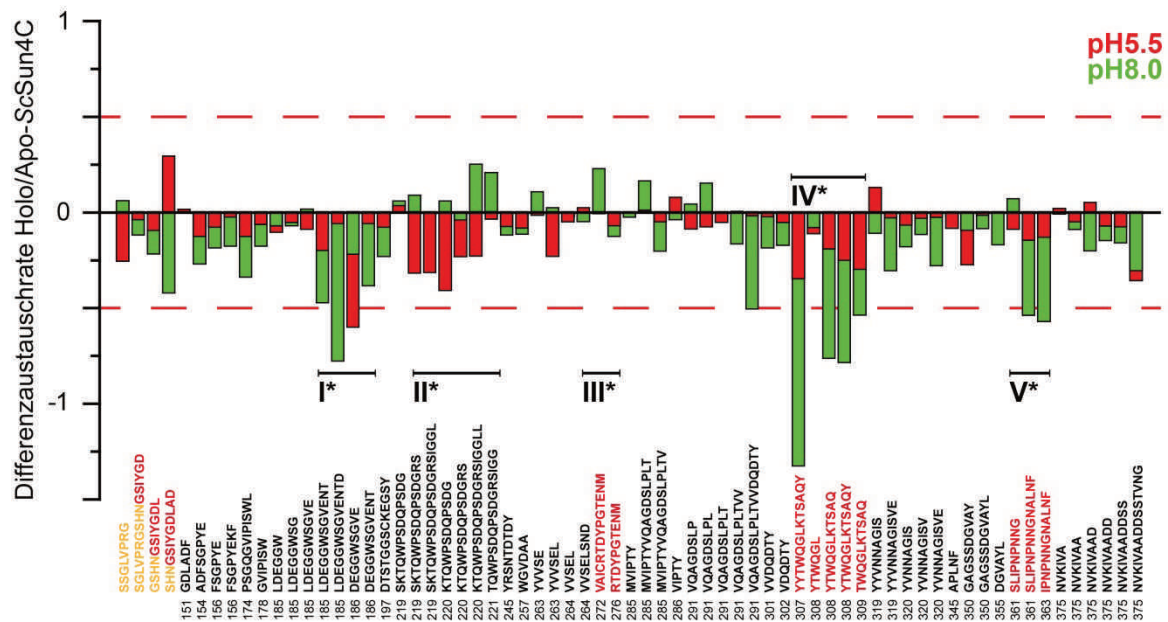


Abbildung 39: HDX-MS Deuteriumaustauschraten wurden für apo*ScSun4C* und holo*ScSun4C* (5 mM Laminarin) in 50 mM Acetatpuffer pH5.5 sowie 10 mM Tris pH8.0 bei einer Inkubationszeit von 15 s in D₂O-Puffer. Die erhaltenen Austauschraten der jeweiligen Peptide wurden getrennt voneinander ausgewertet und abschließend die Differenzaustauschrate (holo - apo) für prominente Peptide berechnet und anhand einer XbarR-artigen Karte grafisch dargestellt. Die roten gestrichelten Linien zeigen die gesetzten Ober- und Untergrenzen für eine signifikante Interaktion. Die dazugehörige Peptidliste im unteren Bereich beginnt mit dem His-tag des rekombinanten Proteins (orange) gefolgt von weiteren Peptiden, wobei Peptide hoher Austauschraten zusätzlich rot markiert sind. Wichtige Bereiche sind hervorgehoben (I*-V*). Die Berechnung des Signifikanzniveaus erfolgte auf Grundlage eines gepaarten t-Tests.

Diese Bereiche sind strukturgebend für die polare Furche von ScSun4C. Ein ähnliches, jedoch abgeschwächtes Muster, zeigt sich bei pH5.5, sodass auch hier die ausgewerteten Peptide der Bereiche I* und IV* leicht reduzierte Differenzaustauschraten aufweisen. Gegenätzlich dazu zeigt sich ein inverses Verhalten für den Bereich II* (219-239, L₆₋₇), da bei pH5.5 eine Reduktion der Deuteriumaustauschraten bei Laminarinzugabe eintritt, für pH 8.0 jedoch dieser Effekt ausbleibt, wobei sogar eine erhöhte Aufnahme der holo- gegenüber der apo-Form von ScSun4C beobachtet werden kann.

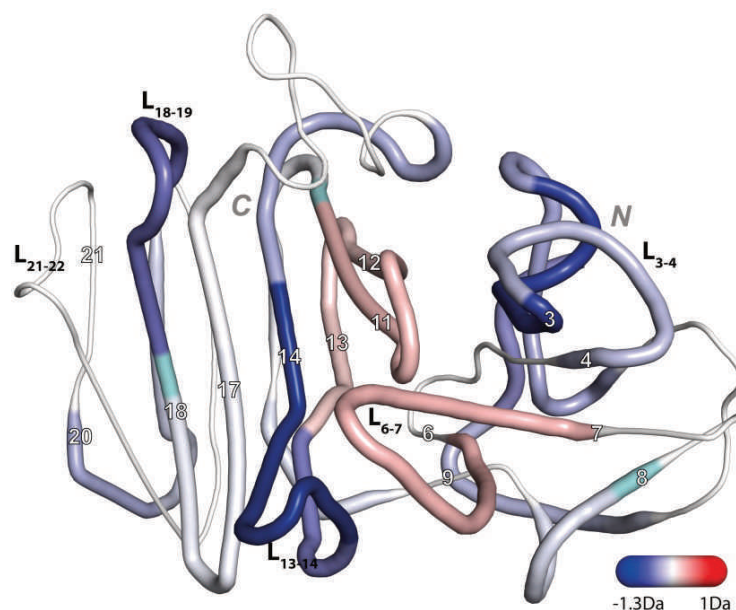


Abbildung 40: Die Differenzaustauschraten für holo – apo ScSun4C pH 8.0 bei 15 s Deuterierung sind anhand der Peptide obiger Abbildung in blau-weiß-rot Darstellung gezeigt. Blau deutet hierbei auf eine Verringerung, rot auf eine Erhöhung der Differenzaustauschraten nach der Ligandbindung hin. Dünne Schlauchbereiche repräsentieren nicht zugeordnete Regionen innerhalb der Struktur.

Rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen (*scanning electron microscopy*, SEM) von pilzlichen Zellwänden zeigen im inneren faserige Überstrukturen, die vorrangig aus β -Glukanen aufgebaut sind. Dabei können unverzweigte, lineare β -1,3-Glukane, entropisch begünstigt, sich zu tripelhelikalen Strukturen zusammenlagern. Diese Triple-Helix wird über zusätzliche intermolekulare Wasserstoff-Brücken Bindungen stabilisiert^{23,182}. Mit diesen Erkenntnissen erfolgten erste molekulare Docking Versuche mittels AutoDock4.2²⁴ für ScSun4C mit Curdlan, einem wasserunlöslichen, unverzweigten Triple-helikalen β -1,3-Glucan hoher Polymerisation (DP>100.000), wobei hier eine modellhafte Länge von DP20 verwendet wurde¹⁸³. Die Ergebnisse der Dockingversuche zeigen, dass die Dimensionen der Furche von ScSun4C in guter Übereinstimmung zur helikalen Struktur von Curdlan stehen.

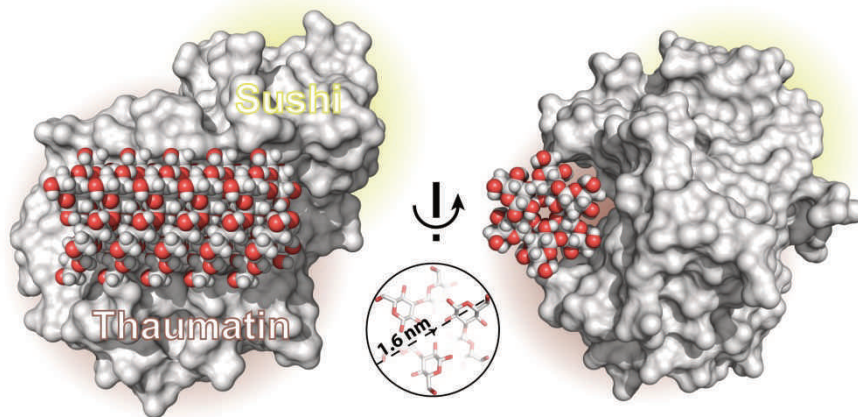


Abbildung 41: Protein Docking mittels AutoDock¹⁸⁴ für ScSun4C und Curdlan (tripelhelikale β -Glukan, DP20). Die verwendete Box wurde so groß gewählt, sodass der Ligand in allen möglichen Bindungsmodi weiterhin innerhalb der Box liegt (136 x 105 x 131 Å). Die Sushi-Domäne ist zusätzlich in gelb und die Thaumatin-Domäne in braun farblich hervorgehoben.

Um die erhaltenen Docking Ergebnisse weiter auszubauen zu können und flexible Bereiche innerhalb des Proteins als auch des Liganden ausmachen zu können, wurden molekulardynamische Simulationen mittels AMBER14¹⁰³, unter Verwendung des Kraftfelder GLYCAM06¹⁰⁴ für den Glukananteil und ff99sb¹⁸⁵ für den Proteinanteil, durchgeführt. Die 100 ns umfassenden MD-Simulationen zeigten, dass ein großer Anteil der Reste innerhalb der polaren Furche H-Brücken zu terminalen Hydroxygruppen der Glukoseeinheiten des Curdlan eingeht. Die prominentesten Reste sind dabei in folgender Abbildung aufgezeigt. Hierbei besteht der Bindungskern aus den oberen Faltblättern der polaren

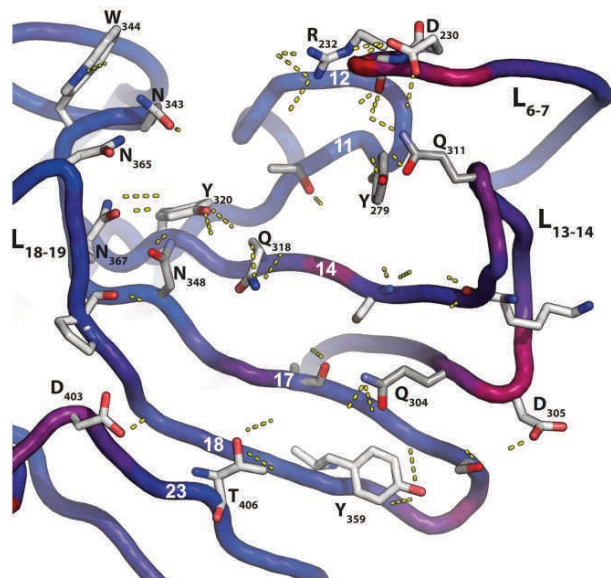


Abbildung 42: Die Berechnung der globalen Kontaktfläche zwischen ScSun4C und dem tripple helikalen Curdlan (DP20) anhand von molekular dynamischen Simulationen. Dabei wurden H-Brücken ausbildende Reste innerhalb von 3,9 Å zum Liganden hervorgehoben. Die Schlauch-Darstellung zeigt farblich die Flexibilität in blau (gering) bis rot (hoch).

Thaumatin-Domäne (β 12, β 11, β 14, β 17, β 18) als Basis und den umschließenden Loopregionen (L_{6-7} , L_{13-14} , L_{18-19}). Dieser Bereich geht hierbei eine Interaktion zu der Triple-Helix, bestehend aus neun Glukose-Einheiten ein, die durch die Loopregionen bis zur Mitte umfasst wird. Betrachtet man die involvierten Reste, so entsteht schnell der Eindruck, dass es sich um eine Oberflächenbasierte Interaktion handelt, die nicht von einzelnen spezifischen Resten abhängt, wie es beispielsweise bei dem epithelialen Adhäsins EPA1⁸⁹ aus *Candida albicans*, der Fall ist, da hier bis zu 22 Aminosäuren in Wechselwir-

kung mit dem Liganden stehen (Abbildung 42).

Betrachtet man das Triple-helikale β -Glukan (DP20) über die gesamten 100 ns der MD-Simulation und bestimmt Aufenthaltszeiten, so erhält man, wie in Abbildung 43 gezeigt, ein hantelförmiges Profil. Dabei zeigt die volumetrische Dichtekarte, die sich aus allen Trajektorien des β -Glukans zusammensetzt, mittig die geringste Mobilität, bedingt durch die vielen H-Brücken im Kern der polaren Furche. Dies spiegelt eine stabile Bindung wieder. Zu den Seiten hin zeigt der stäbchenförmige Ligand aufgrund fehlender Wechselwirkungen zu *ScSun4C* größere Freiheiten, wodurch das charakteristische hantelförmige Muster entsteht.

In späteren Trajektorien (70-100 ns) der MD-Simulation kann für den linearen Liganden ein Abknicken beobachtet werden. Hierbei bleibt die Bindung zum Thaumatin-Kern der polaren Furche weiterhin bestehen, sodass sich die Tripel-Helix auch hier nicht auflöst. Verantwortlich für diesen Vorgang ist die Loopregion L_{6-7} , die einen sterischen Einfluss auf den Liganden ausübt und diesen wegdrückt. Daraus resultiert aufgrund der weiterhin bestehenden Bindung als auch dem sterischen Aufeinandertreffen von Sushi- L_{6-7} und Tripel-Helix ein Wegknicken eben dieser.

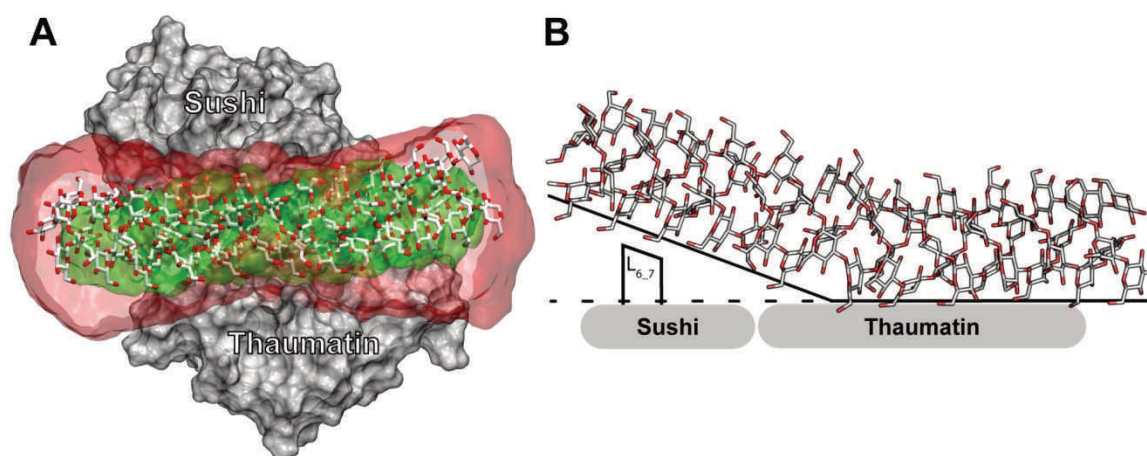


Abbildung 43: Die volumetrische Dichtekarte von Curdlan innerhalb des *ScSun4C* Verbunds auf Grundlage der MD-Simulationen zeigt den Aufenthaltsbereich des Liganden für 100 ns der MD-Simulationen an. Für alle Trajektorien wurde die minimale (grün) und maximale Aufenthaltswahrscheinlichkeit des Liganden mit Hilfe des VolMap Plugins 1.1 durch VMD¹⁰⁵ berechnet. Im letzten Drittel der Simulation (70-100 ns) erfolgt ein Abknicken des Triple helikalen β -Glukans, bedingt durch sterische Abstoßung von Loop6-7 der Sushi-Domäne.

4.2 CFEM-Proteine

Die Gruppe von CFEM-Proteinen (*engl. common in fungal extracellular membranes*) zeigt acht hochkonservierte Cysteine, die anhand eines gruppenspezifischen Musters mit distinkten Abständen der Cysteine zueinander angeordnet sind⁶⁹. Dabei kommen Proteine, die eine CFEM-Domäne tragen, ubiquitär im Reich der Pilze vor, wobei der Großteil aller in der Abteilung der Ascomycota gefunden werden können¹⁸⁶.

4.2.1 Phylogenetische Analyse von CFEM-Proteinen

Die phylogenetische Untersuchung von pilzlichen Zellwandproteinen mit einer CFEM-Domäne, erfolgte ausgehend von einem EFI-EST *sequence-similarity network*, basierend auf den hinterlegten Proteinsequenzen der Interpro Datenbank (IPR008427). CFEM-Domänen kommen, ähnlich den SUN-Domänen nur im Reich der Pilze, beziehungsweise den beiden Phyla der *Ascomycota* (2020 Sequenzen) und *Basidiomycota* (231 Sequenzen) vor. Letztere stellen mit ungefähr zehn Prozent den deutlich geringeren Anteil der bisher bekannten CFEM-Proteine dar. Neben der immensen Anzahl an CFEM-Proteinen (2251 Sequenzen innerhalb 181 Organismen, Stand 20.02.2017) ergeben sich, aufgrund evolutionär bedingter Sequenzähnlichkeiten zwischen einzelnen Proteinen, Sequenzcluster (Abbildung 44).

Diese Gruppierungen sind anhand der prominentesten Vertreter benannt, zumal davon ausgegangen werden kann, dass die Funktion und Eigenschaften innerhalb eines Clusters ähnlich sind. Hierbei haben sich um die Proteine Ccw14, Mad1, Cfma, Pga7 und Pth11 distinkte Gruppierungen herauskristallisiert. Innerhalb der einzelnen Gruppierungen können gruppenspezifische Domänenarchitekturen beobachtet werden. Ccw14-Vertreter zeigen, ähnlich zu pilzlichen Adhäsinen einen ABC-artigen Aufbau auf²⁸. N-terminal beginnend mit einem Signalpeptid, gefolgt von der Funktionsdomäne (A), daran anknüpfend ein S/T-Bereich geringer Komplexität (B) und C-terminal von einem GPI-Anker abgeschlossen (C). Pga7- und Cfma-Orthologe teilen diesen Aufbau, jedoch mit einer verkürzten B-Domäne. Mad1-artige tragen die CFEM-Domäne mittig, leicht zum C-Terminus hin verschoben. Pth11-artige verfügen über eine transmembran-Domäne, gefolgt von einem zytosolischen Bereich, der an der Signaltransduktion ins Zellinnere beteiligt ist⁷⁸.

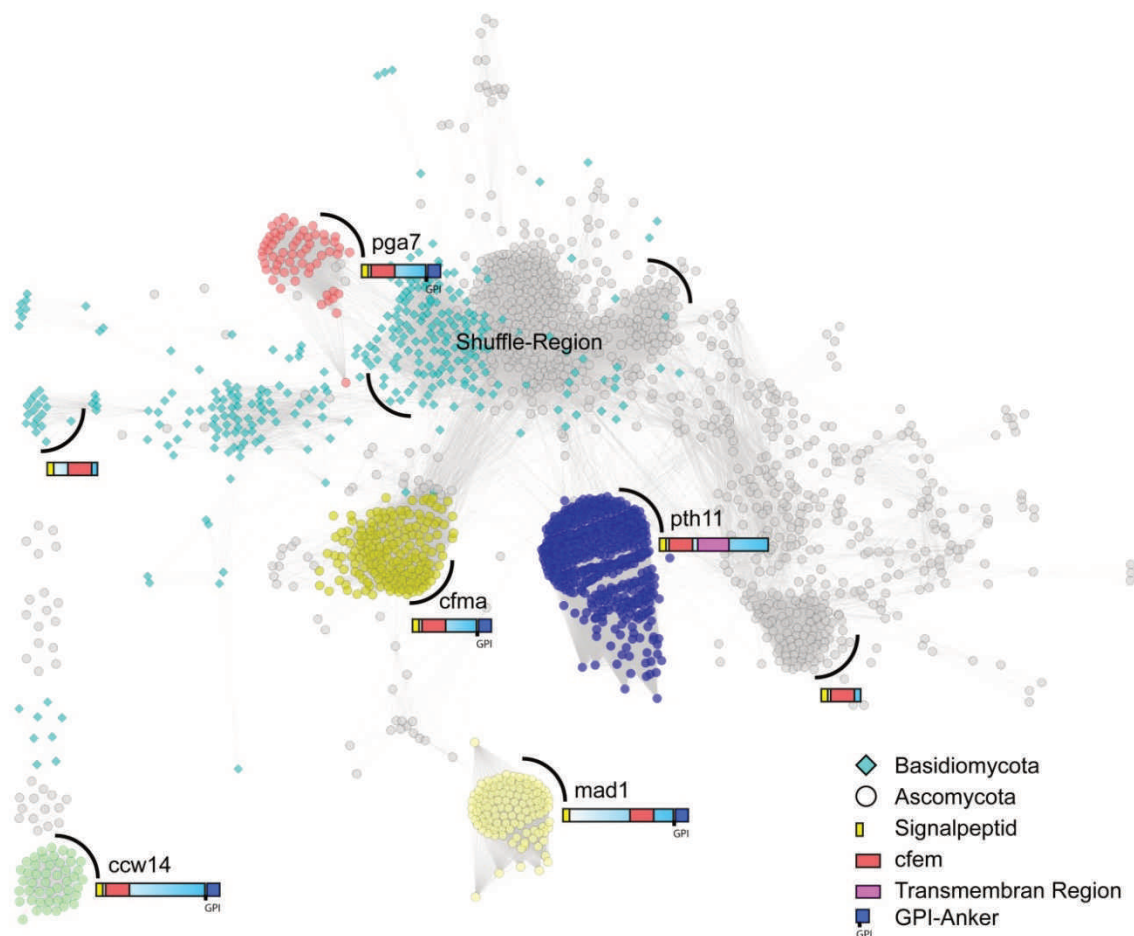


Abbildung 44: Phylogenetische Untersuchung mittels EFI-EST-SSN ($E\text{-value} = 5$, $\text{fraction} = 1$, domain off, $\text{alignment score} = 6$, Gruppirt = 90 %) von CFEM-Proteinen anhand von 2020 Sequenzen aus der Interpro Datenbank (IPR008427). Einteilung der Cluster anhand prominenter Vertreter, Pth11 (blau), Pga7 (rot), Cfma (gelb), Mad1 (beige), Ccw14 (türkis) mit zusätzlicher Unterscheidung anhand der Phyla *Ascomycota* (Kreis) und *Basidiomycota* (Raute). Nicht zugeordnete Sequenzen sind in grau gezeigt. Zusätzlich ist die Domänenorganisationen für die jeweiligen Cluster mit aufgezeigt.

Auf Organismenebene zeigt sich hier, dass Pathogene über eine deutlich höhere Anzahl an CFEM-Proteinen verfügen als nicht-Pathogene, was für eine kleine Auswahl an Organismen in folgender Tabelle zusammengefasst ist. Die Anzahl erhöht sich nochmals deutlich bei Pflanzenpathogenen (Tabelle 4.2.1)¹⁸⁷.

Tabelle 4.2.1: Tabellarische Zusammenstellung für eine exemplarische Auswahl an pilzlichen Organismen und der Anzahl an CFEM-Proteinen.

Organismus / Stamm	Anzahl CFEM-Paraloge
<i>Fusarium oxysporum</i> FGSC 9935	33
<i>Magnaporthe oryzae</i> FGSC 8958	20
<i>Cordyceps militaris</i> CM01	14
<i>Chaetomium thermophilum</i> DSM1495	9
<i>Candida albicans</i> SC5314	6
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288c	1

Neben den bereits vorgestellten Domänenorganisationen von CFEM-Proteinen die aus einer einzelnen CFEM-Einheit aufgebaut sind (~95 % aller Proteine), sind in der PFAM-Datenbank (PF05730) 40 weitere Organisationen von Proteinen, mit bis zu acht CFEM-Einheiten (Uniprot-ID: A0A094IFV1) aufgeführt (Abbildung 45).

Diese Multiplikationen können überwiegend bei Pflanzenpathogenen beobachtet werden. Darüber hinaus sind innerhalb der Shuffle-Region weitere Domänenvariationen, mit Glykosidasen, WSC-Domänen, AMP/NAD-Bindungsdomänen, $\alpha\beta$ -Hydrolasen, oder Peptidasen vorhanden, was auf eine modulare Funktionsarchitektur hinweist.

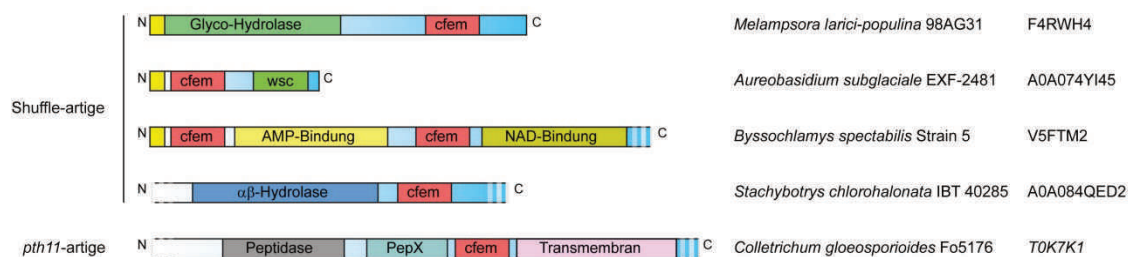


Abbildung 45: Ausgewählte CFEM-Vertreter, die innerhalb der Shuffle-Region (Abbildung 44) gefunden werden können zeigen eine hohe Durchmischung bei der Organisation unterschiedlicher Funktionseinheiten im Zusammenspiel mit CFEM-Domänen. Der blaue Bereich gibt hier ungeordnete, nicht zugewiesene Regionen wieder. Organismus, Stamm und Uniprot-ID.

Auf Proteinsequenzebene zeigt sich in einem multiplen Sequenzalignment prominenter CFEM-Vertreter eine hohe Konservierung für die acht vorhandenen Cysteine (Abbildung 45). Lediglich Mad1-artige unterscheiden sich hier, da diese über lediglich sechs Cysteine verfügen und daraus für Helix₃ und Loop₆₋₇ eine fehlende Disulfidbindung vorhergesagt werden kann. Für den von Cysteinen aufgespannten Bereich ergibt sich eine ausgesprochen hohe Sequenzvariabilität. Bei Betrachtung der Sekundärstrukturelemente, auf Grundlage der Proteinstruktur von KORNITZER *et al.*⁸⁸ CaCsa2 Proteinstruktur, einem Pga7-Vertreter, ergibt sich ein strukturgebendes Motiv, bestehend aus acht Helices, das deutlich die PFAM-Domänengrenzen N- als auch C-terminal überschreitet. Das ist nicht besonders verwunderlich, da die PFAM-Datenbank Proteinsequenzen, bioinformatisch anhand von Mustererkennung nach dem HIDDEN MARKOW MODEL (HMM)¹⁸⁸ Domänengrenzen um hochkonservierte Bereiche (Muster) setzt und diese dann in Proteinfamilien eingruppiert. Dies spiegelt sich in der CFEM-Domäne wieder, da hier auf Sequenzebene lediglich der cysteinreiche Kernbereich aufgrund des hochkonservierten Cysteinmusters über das HMM-Modell erfasst werden kann. Betrachtet man den Bereich der Pth11-artigen, so erhält man auf Grundlage einer Sekundärstrukturberechnung für den N-terminalen Bereich mittels *Jpred4*^{127,186} ähnlich zum Pga7-Typ zwei Helices. Ccw14- und Cfma-Orthologe besitzen N-terminal vor der CFEM-Domäne direkt ein Signalpeptid, sodass diesen Helix 1 fehlt.

Mad1-Orthologe unterscheiden sich hier deutlich von den vorher genannten, da hier N-terminal zur CFEM-Domäne ein Serin-/Threonin-reicher Bereich, geringer Komplexität, angrenzt, sodass dieser laut *Jpred4*^{127,186} keine Sekundärstrukturelemente aufweist. C-terminal fehlt wiederum Ccw14- und Mad1-Vertretern die Helix 7. All diese gruppenspezifischen Unterschiede lassen den Rückschluss zu, dass hier verschiedene Funktionen einhergehen. Für ein tieferes Verständnis dieser äußerst diversen Proteinfamilie, wurden im Rahmen dieser Arbeit prominente Mitglieder einzelner Gruppen strukturell und funktionell untersucht.

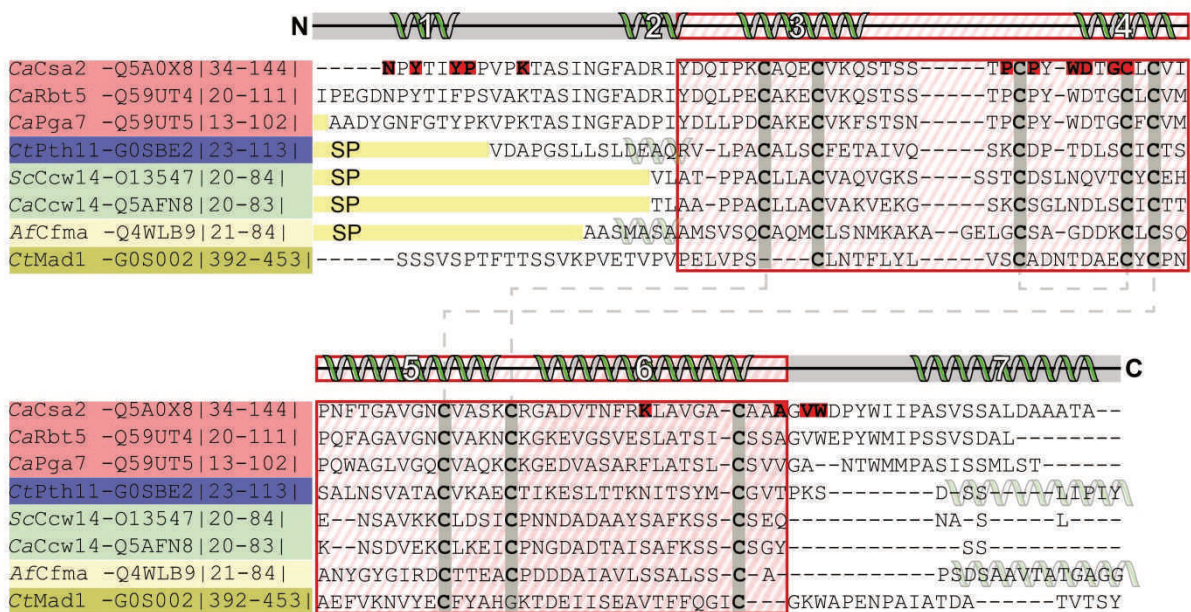


Abbildung 46: Multiples Sequenzalignment mittels ClustalOmega für die CFEM-Domäne von *CaCsa2*, *CaRbt5*, *CaPga7*, *ScCcw14*, *CaCcw14*, *CtPth11*, *AfCfma*, *CtMad1*. Die Sekundärstrukturelemente sind auf Grundlage der *CaCsa2*-Proteinstruktur (4Y7S) über das Alignment gelegt, wobei zusätzlich die mittels Pfam-Datenbank annotierte Domänengrenze für die CFEM-Domäne hellrot umrahmt ist. Die roten Markierungen innerhalb *CaCsa2* geben die Aminosäuren an, die bei der Interaktion mit dem gebundenen Hämin in Wechselwirkung treten. Gelb ist die Position des Signalpeptids mit aufgezeigt. Die rote Box gibt die Position der CFEM-Domäne an.

4.2.2 Expression und Aufreinigung von CFEM-Proteinen

Auf der phylogenetischen Untersuchung aufbauend und der gefundenen Einteilung in die Gruppen Pga7, Pth11, Ccw14, Cfma und Mad1, wurden aus diesen Gruppen repräsentative Vertreter ausgewählt. Diese sollen im Folgenden näher charakterisiert werden um hierüber auf gruppenspezifische Eigenschaften schließen zu können.

Die Domänenarchitektur von CFEM-Proteinen folgt für 95 % dem Ccw14-Typ (Abbildung 47). Dieser ABC-artige Aufbau beginnt N-terminal mit einem Signalpeptid gefolgt von einer CFEM-Domäne (A) an die eine Serin-/Threonin-reiche Region, geringer Ordnung, angeknüpft ist (B). C-terminal abgeschlossen wird das Protein dabei von einem GPI-Anker (C).

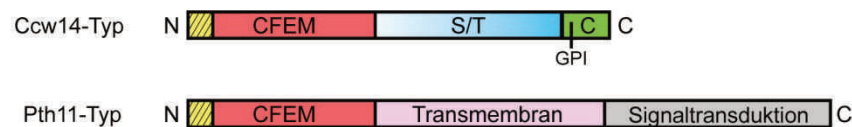


Abbildung 47: Schematische Darstellung der Domänenorganisationen anhand des ABC-Typs (Ccw14) und Pth11-Typs. Beide Typen beginnen N-terminal mit einer Signalsequenz (gelb-gestrichelt), gefolgt von der Funktionseinheit (rot), wobei der ABC-Typ im folgenden eine Serin-/Threonin (S/T)-reiche, meist repetitive, ungeordnete Region (hellblau) abgeschlossen von einer C-Domäne, die die Basis für eine GPI-vermittelte Verankerung darstellt. Der Pth11-Typ zeigt die klassische Organisation eines integralen Membranproteins.

Die in dieser Arbeit hergestellten und näher charakterisierten Proteine, die eine CFEM-Domäne tragen, sind in folgender Tabelle aufgeführt. Zusätzlich ist der Ursprungsorganismus, die Uniprot-ID und der verwendete Sequenzbereich angegeben. Die Plasmide kodierend für die Ccw14-Vertreter aus *Pichia pastoris* (GS315) *PpCcw14A* und *Saccharomyces cerevisiae* *ScCcw14A* sind bereits in einer früheren Arbeit hergestellt und näher beschrieben worden⁸⁸.

Tabelle 4.2.2: Auflistung der hergestellten CFEM-Proteine. Die Beschreibung setzt sich aus dem Ursprungsorganismus (kursiv) und dem in der Uniprot-Datenbank hinterlegten Namen zusammen. Für den Fall, dass eine verkürzte Variante verwendet wurde, die nur die CFEM-Domäne beinhaltet, trägt der Name des Proteins ein A am Ende.

	Organismus	Uniprot-ID	Sequenzbereich	Literatur
<i>CaPga7</i>	<i>Candida albicans</i> SC5314	Q59UT5	18-172	44
<i>CaRbt5</i>	<i>Candida albicans</i> SC5314	Q59UT4	23-219	44
<i>CtMad1A</i>	<i>Chaetomium thermophilum</i> DSM1495	G0S002	391-453	
<i>CtPth11A</i>	<i>Chaetomium thermophilum</i> DSM1495	G0SBE2	36-101	
<i>MgPth11A</i>	<i>Magnaporthe grisea</i> strain 4091-5-8	Q9Y786	31-100	77,78
<i>PpCcw14A</i>	<i>Pichia pastoris</i> DSMZ70382	C4QYN8	22-96	
<i>ScCcw14A</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288c	O13547	19-92	69,189

Die Produktion von CFEM-Proteinen erfolgte mit Hilfe des T7-Expressionssystems in SHuffle T7 Express Zellen (*E. coli*) nach der Niedrigtemperaturmethode bei 12 °C über einen Zeitraum von 72 h. Nach dem Zellaufschluss mittels Zellhomogenisator (FastPrep24) oder French-Press wurde das Lysat in einem zweistufigen Reinigungsverfahren zuerst mittels Ni-Affinitätschromatographie und anschließend über eine Größenausschlusschromatographie (SEC) aufgereinigt (Abbildung 48). Wegen der ausgesprochen hohen Stabilität der CFEM-Domäne, konnte ein Hitzedenaturierungsschritt (70°C, 25min) als zusätzliche Aufreinigungsmethode angewendet werden.

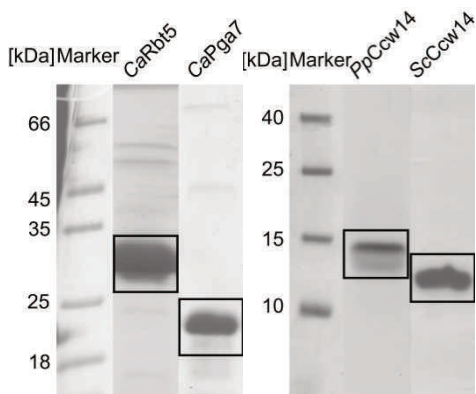


Abbildung 48: Die SDS-PAGE zeigt die aufgereinigten Proteine CaRbt5 (23-219, 22.4 kDa), CaPga7 (18-172, 18.3 kDa), PpCcw14A (22-96, 9.9 kDa) und ScCcw14A (19-82, 9.7 kDa) nach einer NiNTA (Affinitätschromatographie) und SEC (Größenausschlusschromatographie). Der Marker gibt einen vergleichbaren Größenstandard an.

CaPga7 und CaRbt5 konnten nach der Aufreinigung rötlichbraun erhalten werden, wobei erste UV/Vis-Spektren einen häminartigen Verlauf mit einer Soret-Bande bei 410 nm und einer Q-Bande bei 550nm zeigten. Die SEC zeigt für CaPga7 eine Tendenz zur Oligomerisierung, da neben einem monomeren Peak bei 97 mL, eine breitere Multimerfraktion, die einem 6- bis 9-mer zugeordnet werden kann, erhalten werden (Abbildung 47). Diese Multimerfraktion kann sowohl bei apo-, als auch holo-CaPga7-Aufreinigungen beobachtet werden. Nach der Zugabe von Hämin-B kann die zusätzliche Häminabsorption bei 400 nm innerhalb des Multimer-Pga7-Bereiches beobachtet werden (Abbildung 49).

Abbildung 49 zeigt die größenausschlusschromatografische Aufreinigung von CaPga7 (16/60 Superdex 200 pg) mit zwei Detektoren. Die linke Y-Achse misst die Absorption bei 280 nm ($\lambda 1$ (280 nm) (mAU)), die rechte Y-Achse die Absorption bei 400 nm ($\lambda 2$ (400 nm) (mAU)). Die X-Achse zeigt das Volumen in mL (0 bis 130). Ein breiter Peak bei 60-80 mL ist als 'Pga7-Multimer' markiert, mit einer Soret-Bande bei 410 nm. Ein schmalerer Peak bei 97 mL ist als 'Pga7' markiert, mit einer Soret-Bande bei 410 nm. Die Molekulargewichte 75kDa, 29kDa und 14kDa sind ebenfalls eingezeichnet.

Abbildung 49: Die größenausschlusschromatografische Aufreinigung von CaPga7 (16/60 Superdex 200 pg) zeigt eine 280 nm Absorption für das CaPga7-Monomer bei 97 mL und eine zusätzliche breite CaPga7-Multimer Fraktion von 60-80 mL. Die Multimer-Fraktion zeigt eine zusätzliche Absorption bei 400 nm bedingt durch das gebundene Hämin-B

Erste Testexpressionen bei 12°C und 20°C von C_{it}Mad1A(391-453), einem Mad1-Vertreter, zeigten deutlich nach dem analytischen Zellaufschluss, den Verbleib des produzierten Proteins in der unlösli-

chen Fraktion. Testexpressionen für Pth11-artige aus *Chaetomium thermophilum* stehen bisher aus, wobei MgPth11A(31-100) *Magnaporthe grisea* lediglich in der unlöslichen Fraktion gefunden werden konnte.

4.2.3 Funktionelle und Strukturelle Charakterisierung von CFEM-Proteinen

Eine Vielzahl an Kristallisationsansätzen für ScCcw14A, PpCcw14A und CaPga7 wurde im Rahmen dieser Arbeit ausprobiert, wobei verschiedene Additive u.a. Hämin-B zusätzlich eingesetzt wurden und die rekombinanten Proteine mit als auch ohne His-tag eingesetzt wurden. Hierbei konnte sehr hohe Temperaturstabilität sowie ausgesprochen gute Löslichkeit in AM-Puffer (20 mM Tris, 200 mM NaCl, pH 8.0) beobachtet werden. Da Proteinkonzentrationen bis 10 mM erreicht werden konnten ohne, dass es zu einer Proteinpräzipitation kam, wurde für einzelne Kristallisationsversuche das Protein in MES- oder HEPES-Puffer 0.5 pH-Werte vom isoelektrischen Punkt des Proteins umgepuffert. Da in dieser Arbeit keine verwertbaren Proteinkristalle generiert werden konnten wird im Folgenden auf strukturelle Informationen aus der Literatur zurückgegriffen.

NASSER und KORNITZER *et al.* konnten hierbei mit Csa2, aus *Candida albicans*, die erste Proteinstruktur einer CFEM-Domäne strukturell lösen. Dabei konnten drei Moleküle pro asymmetrische Einheitszelle erhalten werden. Hierbei zeigt sich ein kegelförmiger Grundkörper, der aus den fünf antiparallelen Helizes 2-7 aufgebaut und von Helix 4 gekappt wird. Loop1 bildet einen zusätzlichen Deckel oberhalb der Helix 4 und schirmt dadurch das gebundene Porphyrin-Ringsystem gegen Solventeinfluss nach oben hin ab. Alle acht hochkonservierten Cysteine sind an Disulfidbrücken beteiligt, sodass Helix 3 und Helix 5 über zwei Disulfidbrücken verbunden werden und Helix 4 sowohl über Loop3-4 als auch über Helix 6 mittels zweier Disulfidbrücken stabilisiert wird (Abbildung 50).

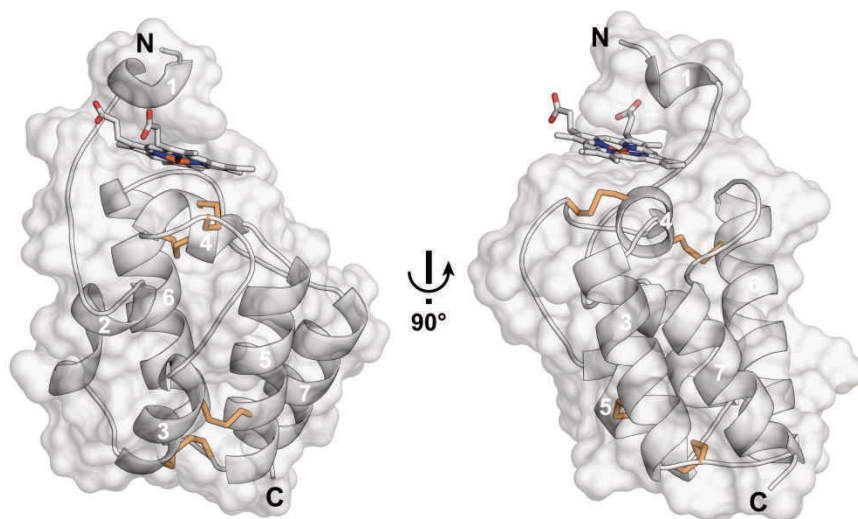


Abbildung 50: Die Proteinstruktur von CaCsa2 (Pga7-Typ, PDB-ID: 4y7s) zeigt einen helikalen Aufbau, bestehend aus sieben Helizes, die über vier Disulfidbindungen (orange) verbrückt vorliegen. DVIR und KORNITZER *et al.* konnten die Proteinstruktur mit dem vermeintlichen Liganden Hämin in der holo-Form kristallisieren⁸⁸.

Die Beschreibung der Domänentopologie verdeutlicht nochmals den einfachen α -helikalen Aufbau von CaCsa2, mit seinen sieben Helizes und den vier Disulfidbindungen (Abbildung 50). Auf dieser Kristallstruktur aufbauend wurde mittels I-TASSER ein Homologiemodell für den Ccw14-Typ aus *Saccharomyces cerevisiae* generiert. Das Resultat ist sowohl in einer Überlagerung zu CaCsa2 als auch alleine dargestellt. Hierbei sticht der konservierte Kernbereich des kegelartigen Grundkörpers besonders zum Vorschein, da dieser eine sehr hohe strukturelle Übereinstimmung zum Ausgangsmodell aufweist, was sich zusätzlich in einer identischen Disulfidverknüpfung zeigt. Jedoch fehlen hier die Helices 1, 2 und 7.

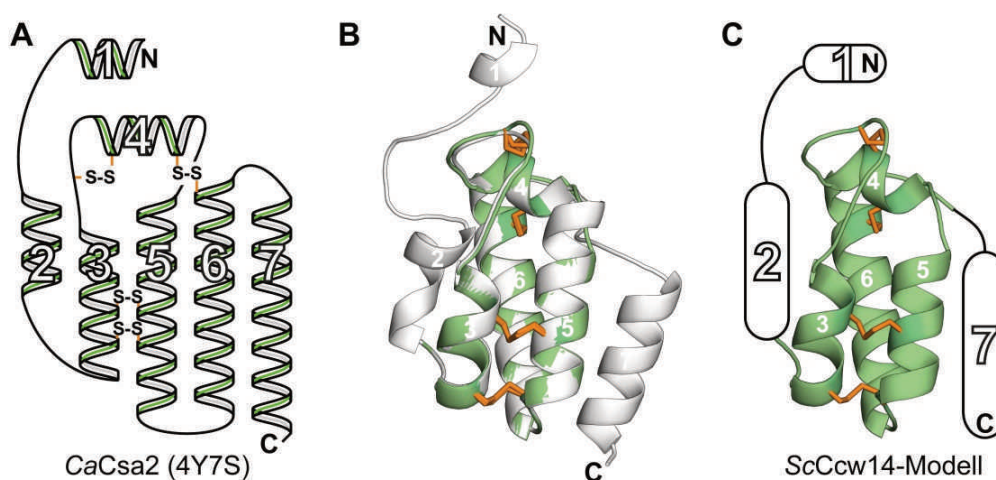


Abbildung 51: A) Beschreibung der Domänentopologie von CaCsa2 bestehend aus den Helices 1-7 sowie der Disulfidverbrückung aller 8 Cysteine. B) Strukturmodellüberlagerung von CaCsa2 (weiß) und ScCcw14A (grün) C) I-TASSER Homologiemodell auf Grundlage von CaCsa2 für ScCcw14 mit der zusätzlichen Angabe fehlender Bereiche verglichen zur Ausgangsstruktur.

Eine Suche nach ähnlichen Faltungsmustern mit Hilfe des PDBeFold-Server¹⁷⁵ brachte keine vergleichbaren Faltungsformen, innerhalb anderer Proteinstrukturen der RCSB *Protein Data Bank*, zum Vorschein, sodass hier von einem neuartigen Faltungsmotiv ausgegangen werden kann.

Um eine Interaktion einzelner Gruppenvertreter gegen Hämin-B aufzeigen zu können, wurden isothermale titrationskalorimetrische Messungen von ScCcw14A und CaPga7 durchgeführt. Hierbei wurden 10 μ M Für ScCcw14A, einen Vertreter des Ccw14-Cluster, konnte hierbei keine Bindung zu

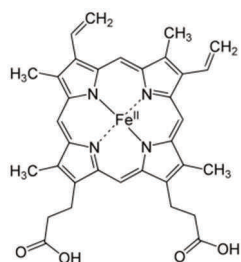


Abbildung 52: Strukturformel für Hämin-B

Hämin-B gezeigt werden, was in Übereinstimmung zur beschriebenen Domänentopologie steht. Die Bindungsisotherme von CaPga7 zeigt eine 1:1 Stöchiometrie mit $N = 1.09 \pm 0.10$, $K_D = 9.46 \pm 0.21 \mu$ M $\Delta H = -3002 \pm 76$ kJ/mol und $\Delta S = -25.23$ kJ/mol.

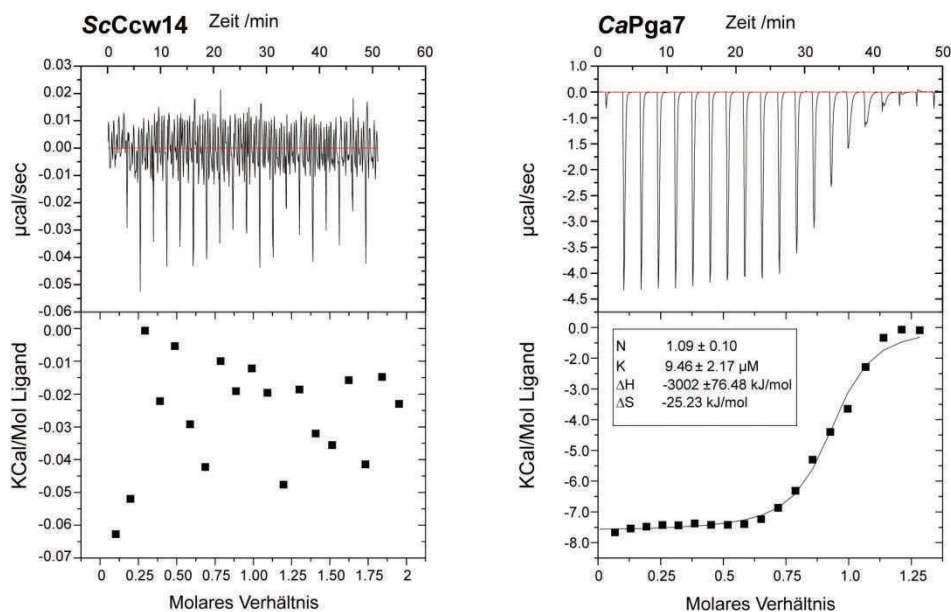


Abbildung 53: Die isothermale titrationskalorimetrische Bindungsuntersuchung von A) *ScCcw14*A(19-82, 9.7 kDa) (100 μ M) und B) *CaPga7*(18-172, 18.3 kDa) (100 μ M) erfolgte durch die Titration des Proteins in eine Häminlösung (10 μ M) bei pH8.0. Die Abbildung beschreibt im oberen Teil die Temperaturänderung, nach jeder Proteininjektion, und im unteren Bereich die daraus berechnete Bindungsisotherme.

Die ITC-Messungen für Ccw14- und Pga7-Orthologe haben gezeigt, dass die Bindung gegen Hämin-B nur von der Pga7-Gruppe realisiert wird.

4.2.4 Zeitabhängige UV/Vis-Spektroskopie von CFEM-Proteinen

Eine zusätzliche, zur isothermalen Titrationskalorimetrie orthogonale Untersuchungsmethode für die Bindung von *CaPga7* und *CaRbt5* an Hämin-B, erfolgte mittels UV/Vis-Absorptionsspektroskopie. Besonders charakteristisch ist hierbei der bathochrome Effekt der Soret-Bande bei 387 nm für Hämin-B, da nach einem Bindungsereignis die veränderte chemische Umgebung bedingt durch den Proteinanteil, eine Rotverschiebung hin zu höheren Wellenlängen erzeugt¹⁹⁰. Darüber hinaus ist der zeitliche Verlauf der Hämin-B Inkorporation durch Messungen nach 10 min, 20 min, 30 min, 40 min 50 min, 60 min und über Nacht (18-24 h) verfolgt worden.

Für *CaPga7* und *CaRbt5* kann ein bathochromer Effekt, nach der Bindung an Hämin-B, mit einem Wellenlängenshift von 25-26 nm für die Soret-Bande beobachtet werden. In der folgenden Abbildung sind die gemessenen Absorptionsspektren zusammengetragen.

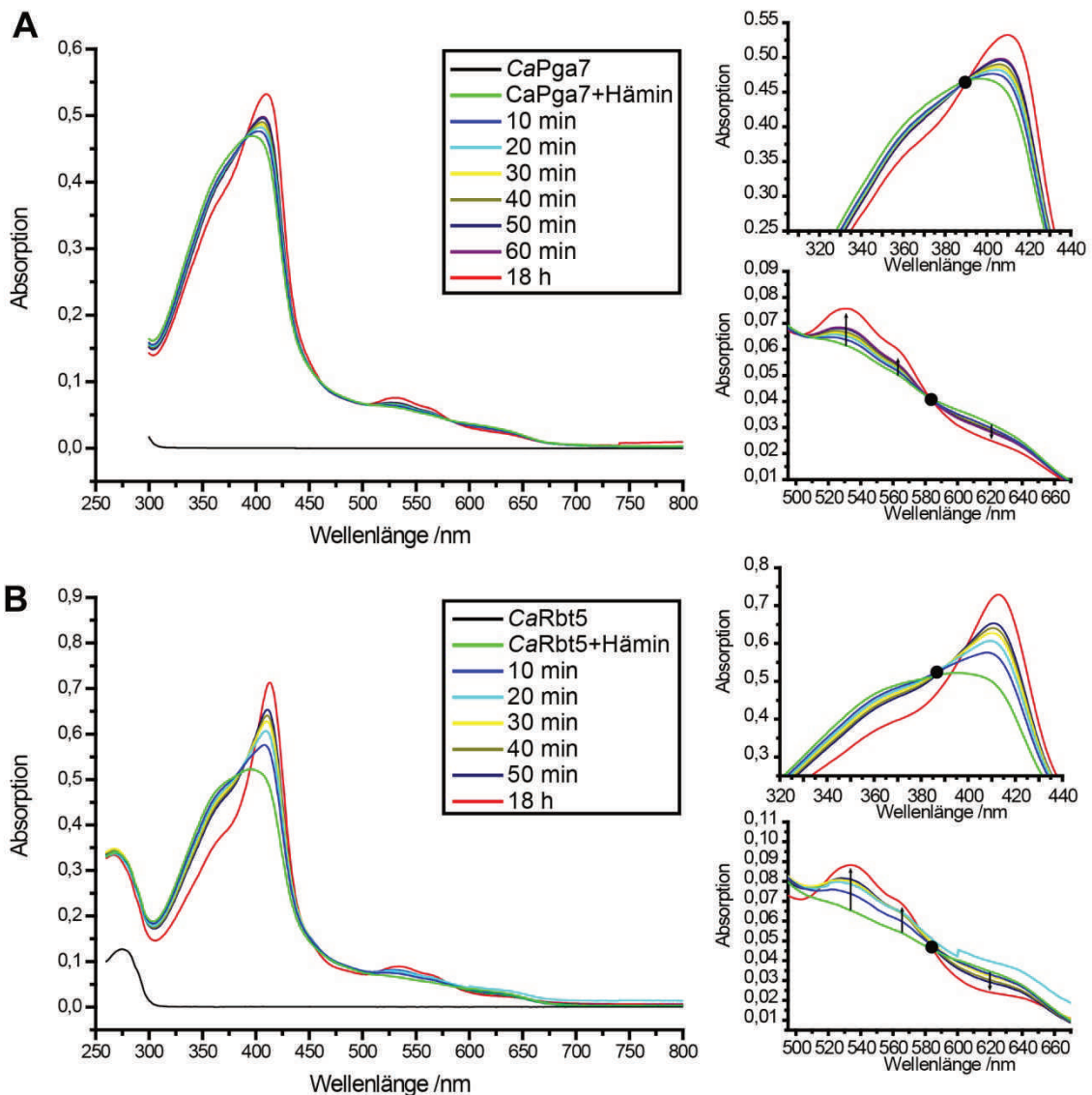


Abbildung 54: UV/Vis Absorptionsspektren von 5 μ M A) *ScCcw14A*(19-82), B) *PpCcw14A*(22-96), C) *CaPga7*(18-172) und D) *CaRbt5*(23-219) in 20 mM Tris 200 mM NaCl pH 8.0 sowie nach Zugabe von 10 μ M Häm in-B bei 10 °C und einem Wellenlängenbereich von 250-800 nm. Der zeitliche Verlauf wurde dann für 10 min, 20 min, 30 min, 40 min 50 min, 60 min und 18-24 h verfolgt. Zusätzlich sind die Bereiche 310-440 nm (Soret Bande) und 500-670 nm (Q-Bande) vergrößert dargestellt. Isosbestische Punkte sind in Form eines schwarzen Punktes gezeigt und schwarze Pfeile geben Bereiche mit Absorptionsveränderung ohne Wellenlängenshift an.

Eine genauere Betrachtung der zeitlichen Verschiebung erfolgte für *CaPga7* und *CaRbt5* weiter im Detail. Hierfür wurde anhand der Soret-Bande, für jeden einzelnen Zeitabschnitt, die Differenzwellenlängenverschiebung zur Häm in-Referenz berechnet und gegen die Zeit aufgetragen (Abbildung 55). Die Beschreibung der experimentellen Daten erfolgte abschließend mittels logistischer Funktion. Diese beschreibt hierbei ein Modell bestehend aus exponentiellem Wachstum mit der zusätzlichen Annahme, dass die Hauptresource während des Prozesses verbraucht wird¹⁶⁷.

In diesem Zusammenhang kann anhand dieser Funktion die Bildungsgeschwindigkeit des Protein-Häm-Komplexes bestimmt werden, wobei die obere Sättigungsgrenze (A_2) bei *CaRbt5* 27.5 ± 0.6 nm und *CaPga7* 26.6 ± 0.5 nm für beide Fälle vergleichbar ist. Signifikant ist hier jedoch der Unterschied

für den Wendepunkt des sigmoidalen Verlaufs (X_0), da hier die mittlere Wellenlängenverschiebung für *CaRbt5* bereits nach 1.72 ± 0.3 min erreicht wird, für *CaPga7* jedoch erst nach 28.06 ± 3.2 min.

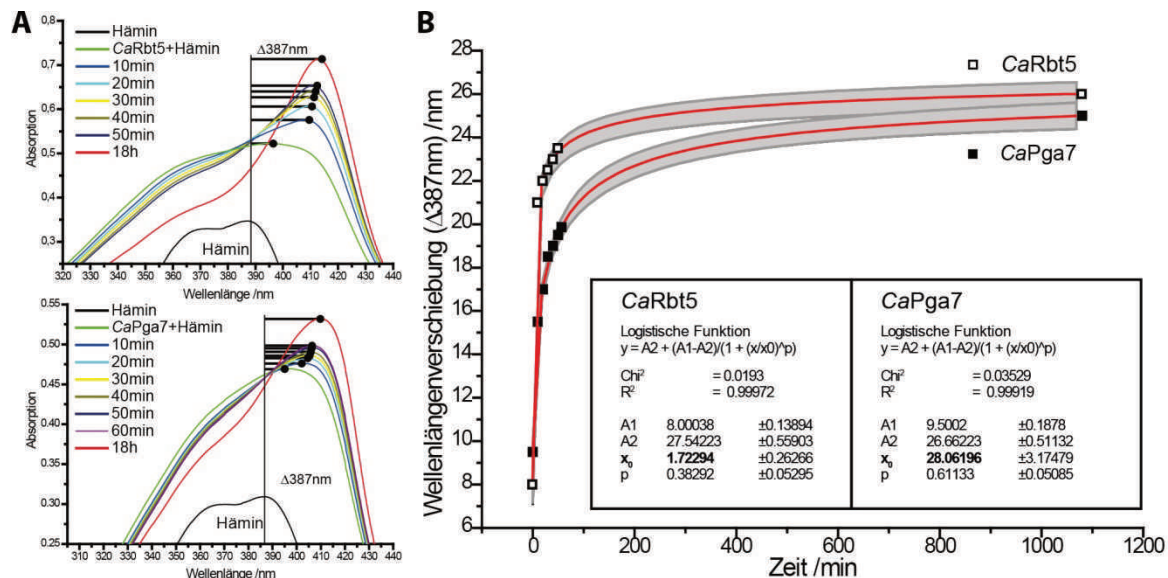


Abbildung 55: A) Ermittlung der zeitabhängigen Wellenlängenverschiebung von *CaRbt5*(23-219) (5 μ M) und *CaPga7*(18-172) (5 μ M) nach 10 μ M Häminzugabe. Die Verschiebung wurde relativ zum Häminabsorptionsmaximum bei 387 nm bestimmt. B) Die Differenz ($\Delta 387$ nm) ist gegen die Zeit aufgetragen. Mit Hilfe einer logistischen Funktion erfolgte die Anpassung der Daten (rot) und der Angabe eine 95 % Vertrauensintervalls (grau). Die erhaltenen Funktionsparameter sind in dem schwarzen Kasten zusammengetragen.

Die Ccw14-Vertreter aus *S. cerevisiae* und *P. pastoris* zeigen im Vergleich zu den Absorptionsspektren der Pga7-Orthologen einen abgeschwächten bathochromen Shift. Die Absorptionsspektren für *ScCcw14A* zeigen im Vergleich zum Hämin-B Referenzspektrum (siehe Anhang 7.6) eine Rotverschiebung von 387 nm auf 493 nm für die Soret-Bande (Abbildung 56A). Dieser leichte Shift im Peakmaximum kann durch eine nicht-bindungsspezifische Koordination von Histidinen, beispielsweise des His-tag, erklärt werden. Für *PpCcw14A* kann eine Wellenlängenverschiebung nach Hämin-B Zugabe von 387 nm auf 407 nm beobachtet werden. Dieser 20 nm Shift liegt von der Verschiebung her zwischen einem deutlich negativen Ergebnis (*ScCcw14A*) und einem positiven Bindungsergebnis der Pga7-Orthologen. Ob die Verschiebung von *PpCcw14* durch eine Beteiligung des His-tag erklärt werden kann, bedarf einer weitere Diskussion.

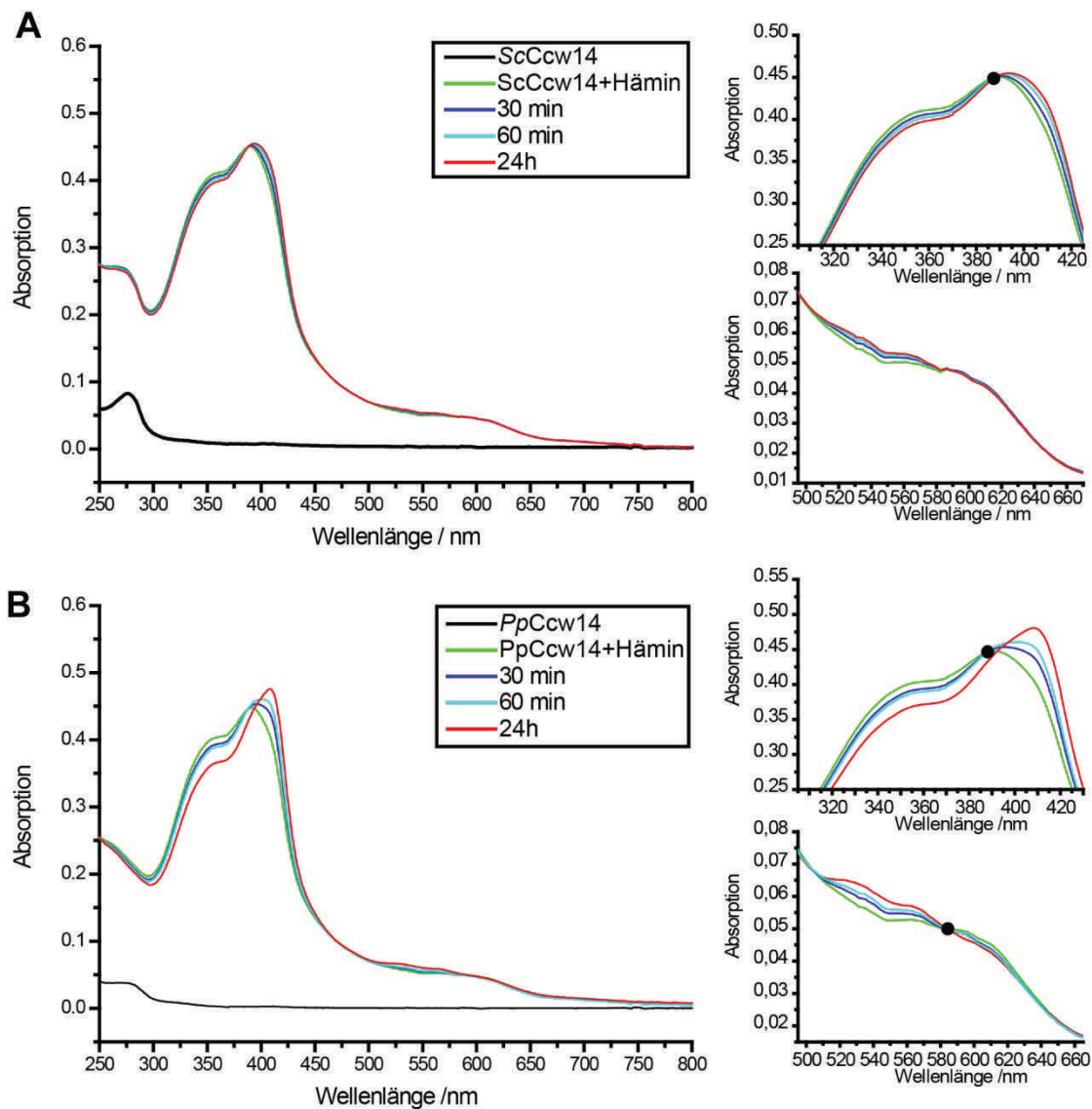


Abbildung 56: UV/Vis Absorptionsspektren von 5 μM A) *ScCcw14A*(19-82), B) *PpCcw14A*(22-96) in 20 mM Tris 200 mM NaCl pH 8.0 sowie nach Zugabe von 10 μM Häm in B bei 10 °C und einem Wellenlängenbereich von 250-800 nm. Der zeitliche Verlauf wurde dann für 10 min, 20 min, 30 min, 40 min 50 min, 60 min und 18-24 h verfolgt. Zusätzlich sind die Bereiche 310-440 nm (Soret-Bande) und 500-670 nm (Q-Bande) vergrößert dargestellt. Isosbestische Punkte sind in Form eines schwarzen Punktes gezeigt und schwarze Pfeile geben Bereiche mit Absorptionsveränderung ohne Wellenlängenshift an.

Eine Auflistung der gemessenen Soret- und Q-Banden für *ScCcw14A*, *PpCcw14A*, *CaPga7* und *CaRbt5* zeigt einen deutlichen bathochromen Shift für die Pga7-Orthologen (Tabelle 4.2.5).

Tabelle 4.2.5: Gegenüberstellung der Soret Banden von *ScCcw14A*, *PpCcw14A*, *PpPga7* und *CaRbt5* nach 18-24 h Hämin-B Zugabe. Das Referenzspektrum für Hämin B ist im Anhang 7.6 abgebildet.

	Soret Bande /nm	Q-Banden /nm
<i>ScCcw14A</i> (19-82)	393	535, 565
<i>PpCcw14A</i> (22-96)	407	535, 565
<i>CaPga7</i> (18-172)	412	532, 560
<i>CaRbt5</i> (23-219)	413	533, 560
Hämin B (pH 8.0)	387	590-610

5 Diskussion

5.1 Die Sekretion von *S. cerevisiae* SUN-Proteinen

Saccharomyces cerevisiae verfügt über die SUN-Orthologe Sim1, Uth1, Nca3, Sun4 und ein bisher nicht näher charakterisiertes Protein YMR244W mit der Uniprot-Bezeichnung Q04018. Nca3 (Uniprot-ID: P46955) ist bei der Uniprot-Datenbank falsch annotiert. Hierbei sollte Nca3 eine Rolle bei der Zellwandorganisation und der Mitochondrienorganisation eine Rolle spielen¹⁹¹. Für Nca3 (engl: *Nuclear control of ATPase protein 2*) ist zudem kein Signalpeptid annotiert worden, wobei eine SignalP-Analyse hier jedoch ganz offensichtlich ein Signalpeptid angibt (Abbildung 57)¹⁹². Lokalisationsuntersuchungen von Nca3-Proteinen könnten hierbei schnell auflösen, wo das Protein aufzufinden ist.

YMR244W (Uniprot-ID: Q04018) unterscheidet sich von den anderen SUN-Proteinen in *S. cerevisiae* dadurch, dass es bei einer phylogenetischen Betrachtung zu den Adg3-artigen in Gruppe II eingeteilt werden kann. Die Uniprot-Annotation für Sequenztopologien zeigt N-terminal eine Transmembranregion von Aminosäure 6-26 an. Auch hierbei handelt es sich um eine Falschannotation, da die aktuelle SignalP4.0 Variante hier eindeutig ein Signalpeptid anzeigt¹⁹².

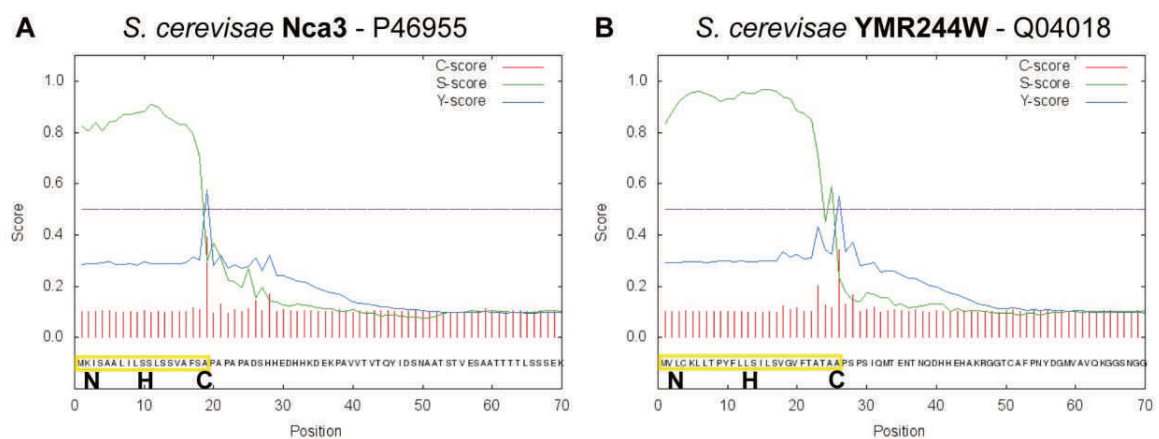


Abbildung 57: SignalP4.0 Untersuchung von Nca3 und YMR244W aus *S. cerevisiae* zeigt für beide Proteine ein N-terminales Signalpeptid und keine Transmembran-Region. Der gelbe Kasten zeigt das Signalpeptid bestehend aus dem N-, H- und C-Bereich.

Obwohl es für Signalpeptide keine Konsensus-Sequenz gibt, folgen diese Strukturen einem modularen Muster bestehend aus drei Bereichen. Dabei bestehen die ersten 15 – 30 Aminosäuren des N-Terminus aus einer positiv geladenen N-Region, einer hydrophoben H-Region sowie einer C-Region, die die teilkonservierte Signalpeptidase-Schnittstelle trägt¹⁹³. Da die H-Region aus mindestens sechs hydrophoben Resten besteht, ist hierdurch die Falschannotation zustande gekommen, da es außer der Länge per se keinen direkten Unterschied zu einer Transmembranhelix gibt. Lediglich das Vorhan-

densein von N-, H- und C-Region mit der proteolytischen Schnittstelle schließen eine Verankerung von YMR244W in der Plasmamembran über eine Transmembranhelix aus.

Diese bioinformatischen Ergebnisse legen nahe, dass alle in *S. cerevisiae* annotierten SUN-Proteine den Weg von sekretierten Proteinen durchlaufen und ihre Funktionen im Bereich der pilzlichen Zellwand erfüllen.

5.2 Zwei Domänen-architektur zur Bindung komplexer Glukanstrukturen

Die SUN-Domäne bindet β -1,3-Glukane, was in Oberflächenplasmonresonanzmessungen innerhalb dieser Arbeit für *CaSun41C* und *ScSun4C* gezeigt werden konnte. Als wasserlösliches β -1,3-Glukan wurde Laminarin für die SPR-Messungen verwendet. Aufgrund der Extraktionsmethode, die zur Laminaringewinnung verwendet wird, handelt es sich hierbei um ein polydisperses Gemisch³⁷. Für die Annahme, dass nur 10% des polydispersen Laminaringemisches in Form einer tripelhelikalen β -Glukanhelix (DP25) eine Bindung mit *ScSun4C* oder *CaSun41C* eingeht, ergeben sich deutlich höhere Bindungskonstanten, die im mikromolaren Bereich anzufinden sind¹⁹⁴. Aus den 3.6 mM bzw. 1.3 mM Dissoziationskonstanten ergeben sich nach einer Abschätzung für den Fall, dass nur ~10 % des Laminaringemisches aktiv an der Bindung beteiligt sind, Dissoziationskonstanten von ~0.1 mM für *ScSun4C* und ~0.05 mM für *CaSun41C* (Tabelle 5.2).

Tabelle 5.2: Theoretische Anpassung der Bindungskonstante für *ScSun4C* und *CaSun41C* aus den experimentellen SPR-Daten, unter Berücksichtigung, dass nur 10%, 1% oder 10% als tripelhelikale DP25 Spezies des polydispersen Laminaringemisches an einer Interaktion beteiligt sind^{35,37}.

	K_D	Theoretische Annahme für		
		10% DP25	10% Triple-DP25	1% DP25
<i>ScSun4C</i>	3.6 \pm 0.7 mM	0.5 mM	0.1 mM	40 mM
<i>CaSun41C</i>	1.3 \pm 0.4 mM	0.1 mM	0.04 mM	1 mM

Die Varianten R230L/D232L, E283A, Q308A, Q318C/W/A, N343L von *ScSun4C*, zielen auf Veränderung innerhalb der polaren Furche hin, über die Rückschlüsse zum Bindungsverhalten bezüglich Laminarin erhalten werden sollen (Abbildung 58A). Dabei zeigt die Q292C-F Variante, an die ein Fluorescein kovalent gebunden wurde, eine sehr starke Reduktion der Laminarinbindung im Vergleich zur fluoresceinfreien Q292C-Variante. Q292 befindet sich zur polaren Furche am entgegengesetzten Ende der theoretischen Tunnelpassage und damit eigentlich zu weit weg, um an einer Bindung weiterhin beteiligt zu sein (Abbildung 58B). Eine mögliche Erklärung hierfür kann ein Modell liefern, in dem eine β -Tripelhelix innerhalb der polaren Furche im mikromolaren Bereich gebunden wird. Diese Helix verfügt über zusätzliche β -1,6-Verzweigung, die radial von der Helixachse nach außen hin abgehen. Eine dieser Verzweigungen kann dann Platz in der hypothetischen Tunnelpassage

finden (Abbildung 58B gelb). Die Tunnelpassage von *ScSun4C* wird überwiegend durch basische und unpolare Reste der Loops 11-12 sowie des β -Faltblatts 6 gebildet (Abbildung 58B). Anders als in glukabinbindenden Proteinen üblich, sind keine aromatischen Aminosäuren um den Tunnel herum vorhanden¹⁹⁵. Das aktive-Zentrum der β -1,3-Glucanase Rv0315 aus *Mycobacterium tuberculosis* zeigt ein für Glukanhydrolasen typisches E-Y-E-Motiv aus zwei katalytisch aktiven Glutaminsäuren^{196,197}. Für *ScSun4C* kann ein solches Motiv nicht direkt beobachtet werden. Jedoch verfügt der hochkonservierte Bereich des β -Faltblatts 11 über ein leicht abgeändertes D278-Y279-E283 Motiv. Obgleich die Aktivitätstests gegen β -Glukane für *ScSun4C* negativ gewesen sind, kann eine Hydrolyse von speziellen Verzweigungen innerhalb der SUN-Kavität nicht vollständig ausgeschlossen werden. Die räumliche Konzentrierung von Resten um den SUN-Tunnel herum, die eine enzymatische Funktion erfüllen könnten, kann ein Hinweis darauf sein. Hierbei kann die Triade bestehend aus den Aminosäureresten Lys220, Arg276 und Asp278 hervorgehoben werden, da diese Reste die Kavität im oberen Bereich einschnüren und damit einen flaschenhalsähnlichen Eingang erzeugen (Abbildung 58B-Stern). Die Abstände innerhalb der Triade betragen hierbei 0.8 x 0.8 x 0.3 nm und sind damit ausreichend groß für einen einzelnen Glukanstrang (Abbildung 58B-Vergrößerung).

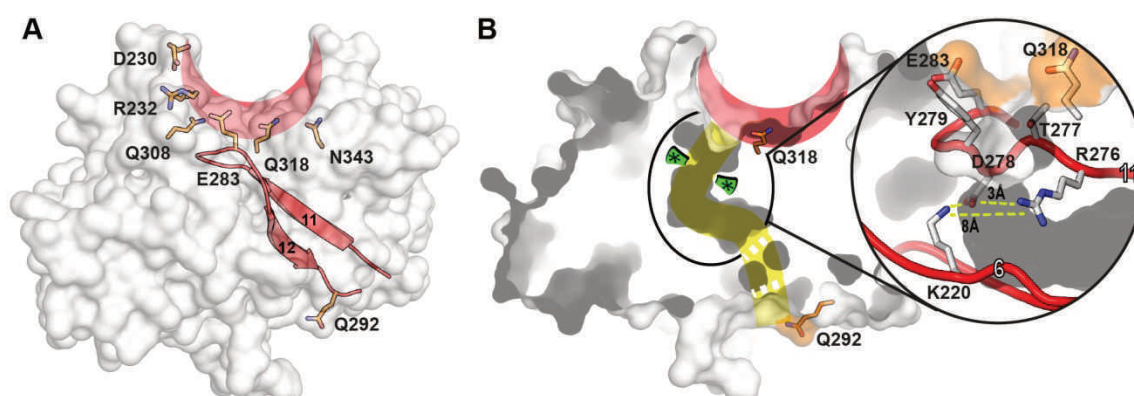


Abbildung 58: A) Darstellung der Bindungsspalte (rot) von *ScSun4C*. B) Querschnitt durch *ScSun4C* zeigt einen Tunnel (gelb), der sich mittig von der Bindungsfurche mit einer einzelnen Unterbrechung bis zu Q292 durchzieht. Die flaschenhalsähnliche Verengung im oberen Bereich der Kavität ist mit Stern (*) gekennzeichnet. Eine Vergrößerung um den Flaschenhals zeigt die Triade aus Lys220, Arg276 und Asp278.

Die Wasserstoff-Deuterium-Austauschexperimente von *ScSun4C* mit Laminarin zeigen charakteristische Lücken bei der Zuordnung der Peptide. Diese werden überwiegend durch eine sehr kompakte und ausgesprochen stabile Struktur bedingt. Selbst die Zugabe von 100 mM TCEP als Reduktionsmittel war nicht ausreichend um die Disulfidbindungen vollständig zu spalten, sodass einige cysteinhaltige Peptide nicht erfassbar waren. Eine vollständige Reduktion von cystinreichen Proteinen konnte von TRABJERG *et al.* nur mithilfe einer elektrochemischen Zelle erreicht werden¹⁹⁸. Für die β -Stränge β 12, β 13, β 13' und β 14 innerhalb der Thaumatin-Domäne von *ScSun4C*, konnte bei

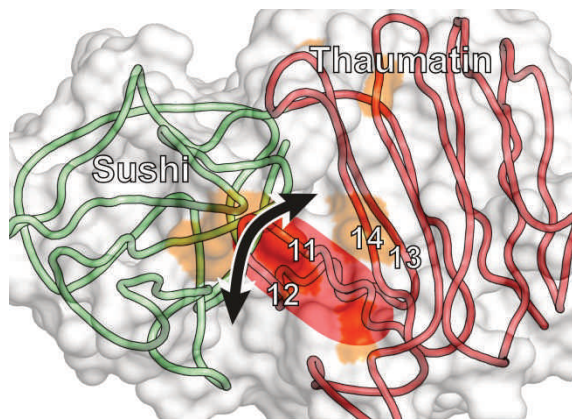


Abbildung 59: Modell eines flexiblen β -Hairpins L11-12 zur Vergrößerung der Kavität von ScSun4C.

zu lassen. Gleichzeitig ist auch eine Verkippung der gesamten Sushi-Domäne denkbar, die zum selben Resultat führen würden. Dieses *induced fit* ähnliche Verhalten kann bei einer Vielzahl an Enzymen, wie beispielsweise der ATP-abhängigen Hexokinase StHK aus *Sulfolobus takadai*, oder der Glykosylhydrolase Cel5B aus *Bacillus licheniformis* beobachtet werden¹⁹⁹. B/Cel5B aus der GH5-Familie zeigt eine bilobale Proteinstruktur bestehend aus einem Immunoglobulin-artigen (IgG) und einem Kohlenhydratbindenden-Modul (CBM46) Nach LIBERATO *et al.* erfolgt hierbei nach der Bindung an Cellulose ein ausgeprägter *induced-fit* Mechanismus mit einer weitreichenden strukturellen Umordnung des IgG-Moduls²⁰⁰.

Ein struktureller Vergleich von ScSun4C mit Rv0315 aus *Mycobacterium tuberculosis* zeigt ein ähnliches Faltungsmuster. Zwar handelt es sich bei Rv0315 nicht um eine thaumatococci-artige-Domäne, jedoch ähnelt der β -Sandwich Aufbau deutlich dem der SUN-Proteine (Abbildung 60A). Strukturell kann eine Verwandtschaft zur Laminarinase aus *Zobellia galactanivorans* (ZgLamA), aus der Glykosylhydrolase Familie 16 beobachtet werden (Abbildung 60C)¹⁷⁹.

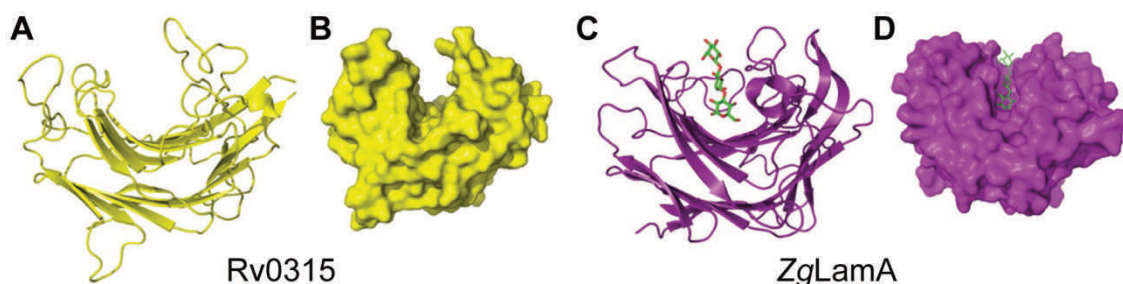


Abbildung 60: Darstellung der Proteinstrukturen von Rv0315 und ZgLamA mit einem Faltungsvergleich. A,B) zeigt die β -Sandwich-Struktur von Rv0315 aus *Mycobacterium tuberculosis* mit der zusätzlichen Anzeige der potentiellen Bindungsfalte. C,D) zeigt die β -Sandwich-Struktur der Laminarinase aus *Zobellia galactanivorans* mit einem gebundenen Tetramer innerhalb der Bindungsfurche¹⁹⁶.

Diese Familie zeigt eine endo- β -1,3-glucanase Aktivität. Trotz der strukturellen Ähnlichkeit zu ZgLamA zeigt Rv0315 bei ITC-Messungen kein Bindungsverhalten für Laminarin, sodass hier DONG

et al. von einer inaktiven β -1,3-Glucanase ausgehen¹⁹⁶. Ein Vergleich der Bindungsfurchen von Rv0315 und ZgLamA mit ScSun4 zeigt hingegen deutliche Unterschiede auf. Die Laminarinase ZgLamA aus *Zobellia galactanivorans* konnte mit einer gebundenen Tetraose kristallisiert werden und zeigt dabei eine schmale circa 8 Å breite Einkerbung, die sich im inneren Bereich des Proteins leicht weitet (Abbildung 61B)^{179,196}. Trotz der strukturellen Ähnlichkeit von Rv0315 im Vergleich zu ZgLamA zeigt sich hier eine breitere und deutlich tiefere Einkerbung innerhalb der Struktur, die im unteren Bereich vom Durchmesser her der ScSun4C-Furche ähnelt (Abbildung 61A). ScSun4C zeigt neben der ~16 Å breiten Einkerbung zusätzlich als einzige Struktur, im Vergleich zu den endo-Glukanasen, eine zusätzliche Kavität innerhalb der Struktur (Abbildung 61C).

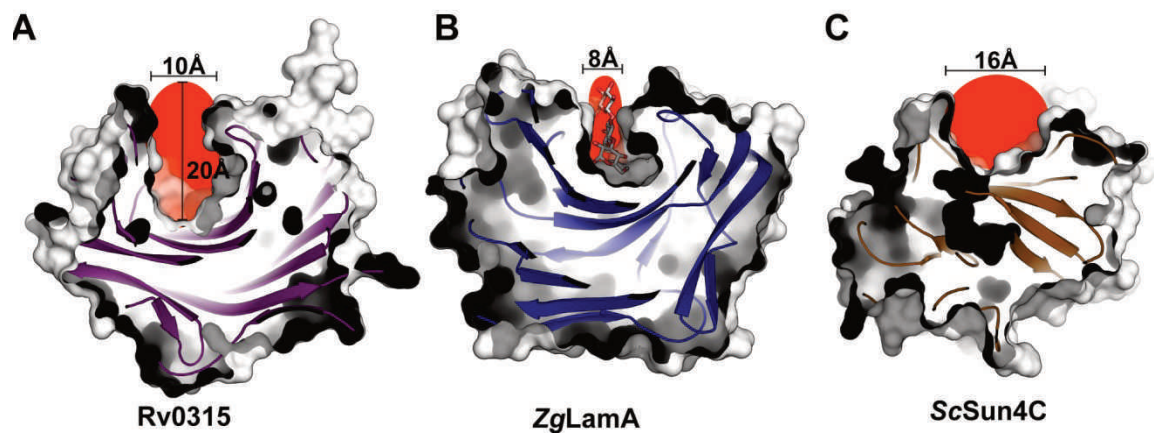


Abbildung 61: Struktureller Vergleich der Bindungsfurchen A) Rv0315 zeigt eine ovale 20 x 10 Å große, konvexe Einkerbung (4WZF) B) zeigt die Proteinstruktur der Laminarinase aus *Zobellia galactanivorans* mit einer gebundenen Tetraose (4BOW). C) zeigt die 16 Å große Furche mit einer zentralen Kavität von ScSun4C.

5.3 Funktionsmodelle von SUN-Proteinen in pilzlichen Zellwänden

Auf Grundlage der positiven Bindungsergebnissen und der näheren Eingrenzung der Bindungsstelle für β -1,3-Glukane, sowie dem Vorhandensein einer zentralen Kavität innerhalb der ScSun4C-Proteinstruktur, können hieraus mehrere Funktionsmodelle postuliert werden.

5.3.1 Modell 1: Die SUN-Domäne als reversible Ankerstelle innerhalb der Zellwand

Die C-terminale SUN-Domäne trägt keinen GPI-Anker und zeigt bei Lokalisationsuntersuchungen in *S. cerevisiae* eine homogenen Verteilung innerhalb der pilzlichen Zellwand. Die Interaktion zu β -1,3-Glukanen erklärt hierbei, wieso das sekretierte Protein nicht aus der Zellwand heraus diffundiert und innerhalb der Zellwand lokalisiert werden kann. Wegen der endständigen Position innerhalb der Proteinsequenz kann hier eine Funktion als Anker-Domäne näher in Betracht gezogen werden (Abbildung 62). Die Verankerung von sekretierten Proteinen innerhalb der pilzlichen Zellwand erfolgt bevorzugt über eine GPI-Anker-vermittelte Anheftung des Proteins an β -1,6-Glukanseitenketten¹. Erste Protein-Anker-Domänen konnten zudem für Pir-Proteine (engl: *Proteins with internal repeats*, Pir) gezeigt werden^{48,201}. Pir-Proteine tragen ein repetitives Muster aus DGQXQ Aminosäuren und verfügen über keinen C-terminalen GPI-Anker²⁰². Verankert werden Pir-Proteine über Ester-Bindungen an β -1,3-Glukanen, wobei ein hypothetisches Modell als Glukanvernetzer aktuell zur Diskussion steht²⁰³. Bisher bekannte Proteinverankerungen innerhalb der pilzlichen Zellwand sind kovalenter Natur und daher irreversibel. Eingebachte Proteine können nicht flexibel umorganisiert werden, ohne ganze Glukanketten mittels Glykosylhydrolasen oder Glykosyltransferasen zu reorganisieren. Anders verhält es sich hier bei dem Strukturmotiv der C-terminalen SUN-Domäne. Diese

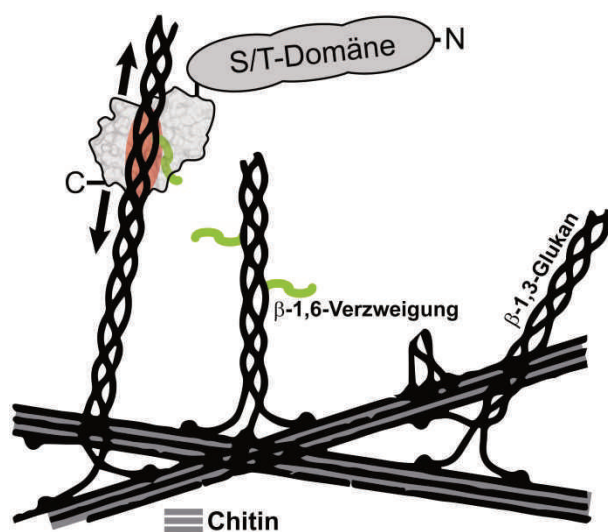


Abbildung 62: Modell als Docking-Domäne von ScSun4 mit Anlagerung der C-terminalen SUN-Domäne an tripelhelikale β -1,3-Glukane und zusätzlicher β -1,6-Verzweigung.

bindet bei niedriger mikromolarer Affinität an tripelhelikale β -1,3-Glukane, wobei eine zusätzliche Präferenz zu besonderen Verzweigungen nicht ausgeschlossen werden kann, und präsentiert die hochglykosylierte S/T-reiche N-terminale Domäne innerhalb der pilzlichen Zellwand (Abbildung 62). Zwar konnte nach GASTEBOIS *et al.* eine leichte exo- β -1,3-glucanase Aktivität für die heterolog in *P. pastoris* produzierten Vollängenproteine, AfSun1 und CaSun41 gezeigt werden^{45,60}. Für die reine SUN-Domäne aus

S. cerevisiae und *C. albicans*, die in *E. coli* produziert und sauber aufgereinigt wurde, konnte hingegen keine Hydrolyseaktivität gezeigt werden. Ein Einfluss des S/T-reichen Bereiches auf die Hydrolysefunktion gilt jedoch als unwahrscheinlich. Eine Erklärung für die geringe Aktivität der Vollänglenkonstrukte kann in der gewählten Aufreinigungsmethode von GASTEBOIS *et al.* gefunden werden. Hier erfolgte eine einstufige Aufreinigung der rekombinanten Proteine AfSun1 und CaSun41 mithilfe von Nickel-Beads ohne eine weitere größenausschlusschromatografische Auftrennung. Folglich können verbleibende Glukosidase-Kontaminationen für diesen Fall nicht ausgeschlossen werden wodurch eine niedrige exo- β -1,3-glucanase Aktivität erklärt werden könnte.

5.3.2 Modell 2: Eine neuartige Funktion als β -1,3-Glukan Helikase

Die entropiegetriebene Präferenz von β -1,3-Glukanen zu übergeordneten Strukturen in Form von Tripelhelizes bedingt, dass ein Großteil der β -Glukane innerhalb der pilzlichen Zellwand in dieser Form vorliegt^{35,39,204}. Während der Abknospung der neugebildeten Tochterzelle von der Parentalzelle muss das zusätzlich gebildete Zellwandmaterial um das Septum herum remodelliert werden^{57,59}. Für die Remodellierung des β -1,3-Materials können in *S. cerevisiae* endo- oder exo- β -1,3-Glucanasen rekrutiert werden. Sofern die Tripelhelizes keine freien nichtreduzierten Enden mehr aufweisen, da diese entweder mit weiteren Chitinlagen verknüpft sind oder sich in benachbarte Tripelhelizes zusammengewunden haben, wäre der erste Schritt für eine Remodellierung eine endo-Hydrolyse eines β -Glukanstrangs. Dadurch würden neue, nichtreduzierte Enden entstehen, die daraufhin durch exo-Glucanasen weiter hydrolysiert werden könnten. Die *in vitro* Hydrolyse von Curdlan, einem unver-

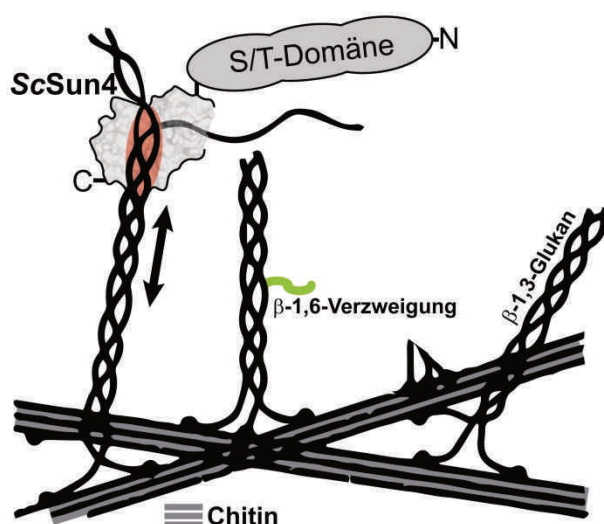


Abbildung 63: Modell der β -Glukan entwindenden Helikase-Domäne. Die SUN-Domäne lagert sich hierbei an ein tripelhelikales β -Glukan, wobei ein Glukanstrang durch den Tunnel geleitet wird und die verbleibenden zwei Stränge in einem leichten Knick als Doppelstrang das Protein verlassen.

zweigigen tripelhelikalen β -1,3-Glukan, konnte bereits für endo-Glucanasen gezeigt werden^{205,206}. Das Temperaturoptimum hierbei liegt auch für mesophile, pilzliche Organismen in einem Bereich zwischen 45-65 °C und damit deutlich über deren physiologischer Temperatur²⁰⁷. Zudem liegen die Hydrolyse-raten für Curdlan hydrolysierende endo-Glucanasen, beispielsweise Endo23 aus *Trichoderma reesei*, auf einem vergleichbar zu AfSun1 niedrigen Niveau^{45,205,206}. Bisher ist jedoch nicht vollständig geklärt, ob die Hydrolyse hierbei nur innerhalb der entwundenen

Enden der Tripelhelix stattfindet, oder ob die Hydrolyse von endo- β -1,3-Glukanasen auch im inneren, geschlossenen Bereich der Tripelhelix, ablaufen kann. Da die Helixbildung temperatur- und pH-abhängig ist, sorgt die hohe Temperatur während des Glukanase-Assay für eine erhöhte Flexibilität der offenen Enden und damit auch für mehr Anknüpfungspunkte^{4,43}. Folglich bleibt weiterhin offen, wie die *in vivo* Hydrolyseraten von endo-Glukosidasen gegen tripelhelikale β -Strukturen aussehen, da bei niedrigen Temperaturen eine thermische Entwindung der Tripelhelizes nicht begünstigt ist.

Um eine schnelle, ortsspezifische Spaltung von tripelhelikalen β -1,3-Glukanen zu ermöglichen, kann das Modell der glukantwindenden Helikase hierbei einige offene Fragen beantworten. *ScSun4C* bindet an Laminarin und molekulardynamische Berechnungen konnten zeigen, dass die Bindung an

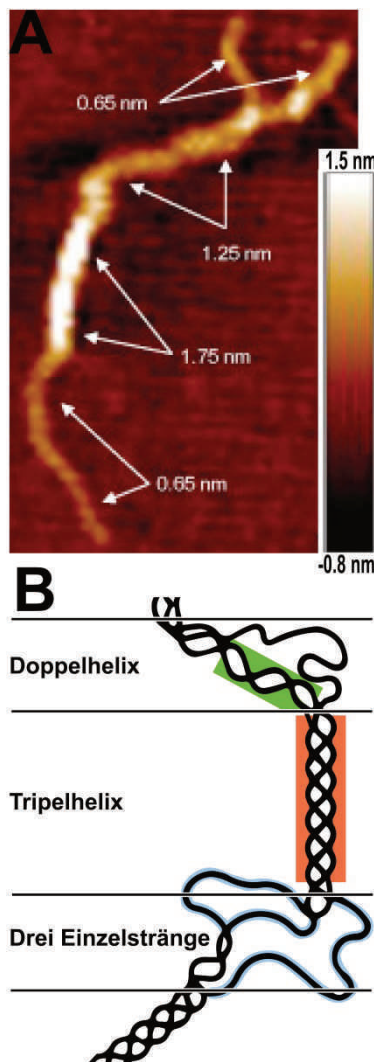


Abbildung 64: A) AFM-Höhenprofil von Curdlan bei 60°C³ B) Schematische Darstellung möglicher Überstrukturen von β -1,3-Glukanen nach SLETMOEN *et al.*⁴

Curdlan über einen zeitlichen Bereich von mindestens 100 ns stabil vorliegt. Unter der zusätzlichen Annahme einer Tunnelregion, die sich zentral von der Bindungsfurche durch die Proteinstruktur zieht, kann für ein Modell mit der Funktionsweise einer Glukanhelikase postuliert werden. Die SUN-Domäne bindet dabei an die Tripelhelix und leitet einen Einzelstrang durch den Tunnel hindurch nach außen. Dieser Einzelstrang wäre dann für exo- und endo-Glukanasen deutlich besser zugänglich und dadurch schneller abzubauen. Ähnlich einer DNA-Helikase könnte die SUN-Domäne auf der Tripelhelix entlang laufen und jeweils einen β -Strang entwinden (Abbildung 64)⁴³.

Im Gegensatz dazu könnte jedoch auch ein inverses Glukanhelikase-Modell denkbar sein. Hierbei würde die SUN-Domäne als Tripelhelix formierende Einheit agieren. Hierdurch könnte der Grad an Tripelhelizes innerhalb der pilzlichen Zellwand erhöht werden. Diese Funktion könnte nach einem Rearrangieren von β -Glukanmaterial sinnvoll sein, da hierbei eventuell auftretende Längenunterschiede beispielsweise eine Doppelhelix mit einem längeren Einzelstrang bewirken könnten (Abbildung 64). Um das β -Glukanmaterial vor Abbau zu schützen, könnte eine endo-Glukanase den Einzelstrang öffnen und *ScSun4* würde diese Doppelhelix zu einer Tripelhelix umorganisieren (Abbildung 64B

grün). Dabei würde die SUN-Domäne einen offenen β -1,3-Einzelstrang über den Tunnel binden, bis zur Tripelhelix weiterwandern um dann die Tripelhelix weiter zu schließen. Thermodynamisch ist zwar eine selbstständige Tripelhelixbildung begünstigt, diese benötigt jedoch für eine höhere Grundordnung den Einfluss von weiteren regulierenden Proteinen.

5.3.4 Der S/T-reiche Bereich von SUN-Proteinen als potentielle Protein-Interaktionsfläche

Unabhängig vom hypothetischen Funktionsmodell der C-terminalen SUN-Domäne zeigen Lokalisationsuntersuchungen von *ScSun4* eine duale, asymmetrische Verteilung, zwischen der Zellwand und der Sprossachse (eng. *birth scar*). Hierbei können unterschiedlichen Antikörper-Zugänglichkeiten für den N- und C-Terminus je nach Position, ob das Protein sich innerhalb der Zellwand oder in der Sprossachse beobachtet werden. Im Bereich der Sprossachse konnte zusätzlich ein Tochterzell-spezifischer Komplex aus den Proteinen *ScSun4*, *ScDse2* und *ScEgt2* gezeigt werden. Eine Deletion von Dse wiederum verhindert diese Komplexbildung, was sich dann in einer homogenen Verteilung von *ScSun4* innerhalb der gesamten pilzlichen Zellwand inklusive Sprossachse zeigt⁶³. Wie der Interaktionskomplex bestehend aus *ScSun4*, *ScDse2* und *ScEgt2* zu einander in Wechselwirkung steht ist bisher unklar und bedarf weiterer Untersuchungen. *ScDse2* (Uniprot-ID: P38844) ist 325 Aminosäuren lang und besteht zum Großteil aus einer Serin-reichen Region mit C-terminalen GPI-Anker. Eine Gemeinsamkeit auf Sequenzebene der drei Proteine liegt in einem hochglykosylierten, ungeordneten Bereich. Theoretische Protein-Glykan-Überstrukturen könnten hierbei eine Erklärung für die von KUZNTSOV *et al.* beobachteten Interaktionen geben⁶³.

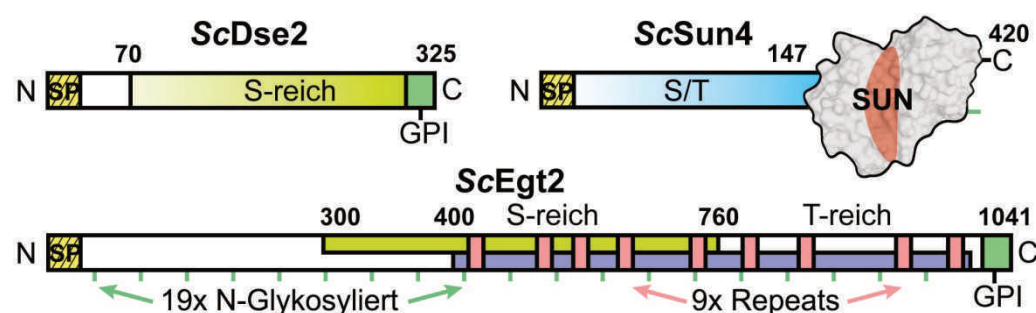


Abbildung 65: Proteinsequenzarchitektur von *ScDse2* (Uniprot-ID: P38844), *ScSun4* (Uniprot-ID: P53616) und *ScEgt2* (Uniprot-ID: P42835). *ScDse2* zeigt besteht zum Großteil aus einer Serin-reichen Region, die von einem GPI-Anker C-terminal abgeschlossen wird. *ScSun4* zeigt N-terminal eine S/T-reiche Region, die von der SUN-Domäne C-terminal abgeschlossen wird. *ScEgt2* zeigt einen hochkomplexen Aufbau, der sich aus einer Vielzahl besonderer Merkmale wie 19 putativen N-Glykosylierungsstellen, 9 Repeats sowie einen großen S-reichen Bereich der in einen T-reichen Bereich übergeht um nur einige zu nennen.

ScEgt2 (Uniprot-ID: P42835) ist 1041 Aminosäuren lang und hochkomplex aufgebaut. Neben 19 potentiellen N-Glykosylierungsstellen, 9 Repeats (25-30 Aminosäuren), einer S-reichen Region, die in eine T-reiche Region übergeht und dabei abgeschlossen von einem C-terminalen GPI-Anker (Abbildung 65). Ein Modell, in dem ähnlich glykosylierte Bereiche miteinander in Wechselwirkung tre-

ten würde für *ScEgt2*, aufgrund dessen S-, S/T- und T-reichen Sequenzbereiche, eine Rolle als Bindungsvermittler nahe legen.

5.4 Ein Ausblick zu SUN-Proteinen

Bisher sind nur Lokalisationsuntersuchungen von Sun4 in *S. cerevisiae* durchgeführt worden. Daher wäre es hilfreich die Lokalisation der vier weiteren SUN-Paraloge genauer aufzeigen zu können. Idealerweise müsste die Auflösungsgrenze deutlich erhöht werden um ein genaueres Bild über den eigentlichen Zellwandaufbau zu erhalten, als es aktuell durch elektronen- und lichtmikroskopische Aufnahmen bisher möglich ist. Eine hierfür hilfreiche Methode ist die von GRÜNEWALD *et al.* beschriebene Energie-Dispersive Laue Diffraktion²⁰⁸. Ermöglicht wird diese Methode durch die Verbesserung der dafür notwendigen pnCCD-Detektoren. Dieser 450 μm dicke Detektor sammelt hierbei in jedem Pixel ein vollständiges Energiespektrum, sodass hierdurch mit nur einer Bestrahlung dreidimensionale Informationen von einer komplexen Probe erhalten werden kann²⁰⁹.

Zusätzlich wären rasterkraftmikroskopische Untersuchungen hilfreich um die Bindung von SUN-

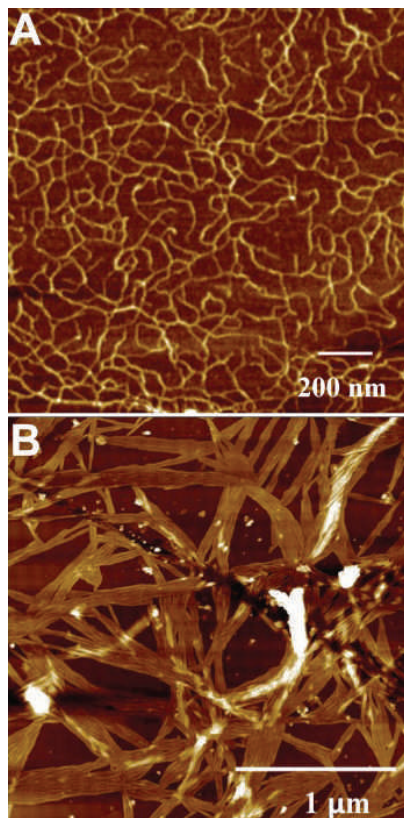


Abbildung 66: TM-AFM Aufnahmen mit 10 mg/L A) Skleroglukan und B) Curdlan bei Raumtemperatur².

Proteinen an β -1,3-Glukane grafisch aufzeigen zu können²¹⁰. Die aktuell erreichbare TM-AFM Auflösungsgrenze ist dabei ausreichend hoch um die tripelhelikalen Strukturen des Skleroglukans darstellen zu können und darüber hinaus daran gebundenes Protein auflösen zu können (Abbildung 66A). AFM-Messungen von Skleroglukan, einem β -1,3-Glucan mit monomeren β -1,6-Glucan-verzweigungen, zeigt bei Raumtemperaturmessungen auf einer *Mica*-Oberfläche ein ungeordnetes Verhalten der Tripelhelizes (Abbildung 66A). Im Vergleich dazu zeigt sich für Curdlan, dem die β -1,6-Glucanverzweigungen fehlen, eine deutlich höher ausgeprägte Tendenz für weitere Überstrukturen (Abbildung 66B)².

Darauf aufbauend könnte die Funktion als Glukanhelikase von SUN-Proteinen mittels AFM-Messungen direkt gezeigt werden, da hier nach der Zugabe von SUN-Protein zu β -1,3-Glukanen, eine sichtbare Änderung der Überstrukturen erkennbar wäre.

5.5 Die Funktionsvielfalt von pilzlichen CFEM-Proteinen

Die Gruppe der sekretierten pilzlichen Zellwandproteine, die eine CFEM-Domäne tragen, ist zahlreich und wegen der modularen Architektur ausgesprochen variabel. In dieser Arbeit konnten über phylogenetische EFI-EST-Untersuchungen distinkte Gruppierungen für einzelne CFEM-Orthologe aufgezeigt werden. Wichtige Funktionen scheinen hierbei unter anderem der Hämintransport ins Zellinnere oder die Remodellierung einzelner Zellwandbestandteile zu sein^{18,44,211,212}. Trotz der geringen Sequenzähnlichkeit innerhalb der CFEM-Domäne scheint auf struktureller Ebene der kegelartig, helikale Grundaufbau domänenspezifisch zu sein, da keine größeren Insertionen für einzelne Vertreter innerhalb der CFEM-Domäne beobachtet werden können.

Es ist davon aufzugehen, dass die Häminbindung hierbei keine klassische, CFEM-Domänen spezifische Funktion ist. Der für die Bindung an Hämin essentielle Asparaginsäurerest D80 im Fall von *CaCsa2* ist für die Orthologen der Pth11-, Cfma- und Mad1-Gruppe konserviert (Abbildung 67A)⁴⁴. Darüber hinaus sind die Aminosäuren, die an der Bildung der Bindungstasche beteiligt sind nur innerhalb der Pga7-Orthologen konserviert (Abbildung 67A). *Ccw14* aus *S. cerevisiae* zeigt genau in diesem Bereich der Helix 4 einen deutlichen Unterschied mit den Resten DSLNQVT. Anstelle des hochkonservierten Asparaginsäurerests, ist hier ein Glutamin vorhanden. Zusätzlich fehlt der als Deckel fungierende N-Terminus in *ScCcw14*, sodass im Falle einer Bindung an Hämin dieses nach oben hin nicht vor Solvation geschützt wäre. Diese genannten Punkte, die auf der Grundlage der *CaCsa2*-Proteinstruktur beruhen, können eine Erklärung sein, wieso keine Bindung von *ScCcw14* an Hämin beobachtet werden kann.

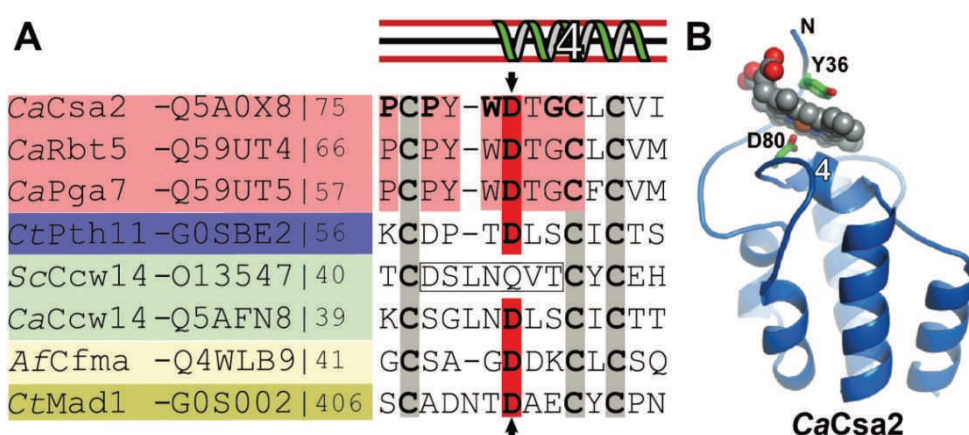


Abbildung 67: A) Sequenzalignment ausgewählter Gruppenvertreter CFEM-tragender Proteine für den Bereich um die Bindehelix 4. Die in rosa hervorgehoben Aminosäuren sind Bestandteile der Bindungstasche. Der Asparaginsäurerest von Helix 4 ist essentiell für die Bindung an Hämin. B) Die Proteinstruktur von *CaCsa2* (PDB-ID 4Y7S) zeigt die Bindung zu Hämin über die Reste der Helix 4 sowie den N-Terminus⁷¹.

Das Ccw14-Ortholog aus *P. pastoris* trägt ein DALN**N**IQ Motiv innerhalb der Helix 4, wobei auch hier kein Asparaginsäurerest für die Koordination des Eisens vorhanden ist. In UV/Vis-Absorptionsspektren dieser Arbeit konnte jedoch ein bathochromer Shift von 387 nm auf 407 nm für die Soret-Bande des Hämins beobachtet werden. Die axiale Koordination von Histidin an Hämin bewirkt einen ähnlichen bathochromen Shift^{213,214}. In diesem Fall müsste der Einfluss des His-tag zur Bindung detaillierter analysiert werden (Tabelle 5.5). Untersuchungen von OWENS *et al.* haben für das sekretierte, häminbindende Protein Rv0203 aus *Mycobacterium tuberculosis* zeigen können, dass der His-tag zwar einen Einfluss auf die Soret-Bande hat, die Bindung selber jedoch nicht beeinflusst¹⁹⁰.

Tabelle 5.5: Eine Zusammenstellung von Hämin bindenden Proteinen mit einer Auflistung der axial koordinierenden Liganden, der Soret- und Q-Banden. Erweitert nach OWENS¹⁹⁰.

	Liganden	Soret-Bande λ_{\max} /nm	Q-Banden
<i>PpCcw14A</i> (hypothetisch)	(His-tag, Gln)	407	535, 565
<i>CaPga7</i>	Asp, Tyr	413	533 560
Cytochrome b	His, His	412	531, 559
Neuroglobin	His, His	413	533, 562
HasA	His, Tyr	406	494, 537, 568, 618
Dap1p	Tyr	398	500, 530, 620
Rv0203-His	His, His	412	533, 560
Rv0203-keinTag	O	392	596, 596
Hämin-B	OH ⁻	385	611

Hämin kommt in der Natur ausschließlich in gebundener Form vor, da freies Hämin auf zelluläre Systeme durch Bildung reaktiver O₂-Spezies toxisch wirkt. Eukaryoten haben daher unterschiedliche Mechanismen entwickelt um freies Hämin zu degradieren²¹⁵. *Plasmodium falciparum*, der Erreger der lebensgefährlichen *Malaria tropicana*, verfügt über ein *Heme Detoxification Protein* (HDP), das zwei Hämine innerhalb einer hydrophoben Bindungstasche bindet. HDP erzeugt dabei ein Hämin-Dimer, das anschließend in einer kristallinen, unschädlichen Hemozoin-Form vorliegt (Abbildung 68)²¹⁶.

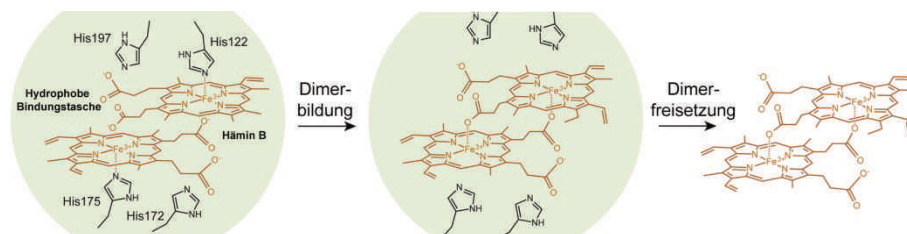


Abbildung 68: HDP bindet Hämin-B in seiner hydrophoben Bindungstasche über vier konservierte Histidinreste und sorgt für stabile eine Hämin-Dimerbildung mit anschließender Freisetzung²¹⁶.

Das eben beschriebene Histidin-Bindungsmotiv von HDP könnte eine Erklärung für den bathochromen Shift der Soret-Bande von *PpCcw14A* liefern. Der *His-tag* des rekombinanten Proteins kann hierbei eine Hämin-Dimerbildung begünstigen und dadurch für ein falsch-positives Bindungsergebnis sorgen.

Untersuchungen von ENE *et al.* haben gezeigt, dass eine Hochregulierung von *CaCcw14* eine erhöhte Stressresistenz in *Candida albicans* zur Folge hat. Ermöglicht wird das durch eine dickere Zellwand, die einen höheren Grad an β -Glukan-Chitin Quervernetzungen aufweist²¹¹. Die Überexpression

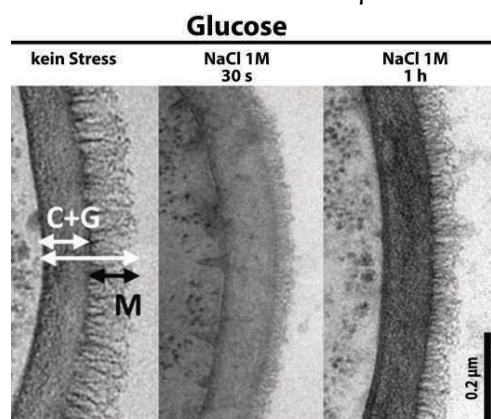


Abbildung 69: TEM-Aufnahmen zeigen dynamische Änderungen der *C. albicans* Zellwandarchitektur bei hyperosmotischen Stress. C: Chitin, G: Glukane, M: Mannoproteine.

CaCcw14 (Ssr1) in Glukose-Medium sorgt hierbei für eine erhöhte Stressresistenz (Abbildung 69). Zusätzlich konnte eine Interaktion von Ccw14 aus *S. cerevisiae* mit der endo- β -1,3-Glucanase Bgl2 mittels *affinity capture-MS* nachgewiesen werden²¹⁷. Diese Wechselwirkung kann eine Erklärung für die Zunahme der Zellwanddicke sein, da beispielsweise Änderungen in der Hydrolyseaktivität von Bgl2 einen Einfluss auf das β -Glukanmaterial zur Folge haben. Ein *Glycan-array screening* durch das

Consortium for Functional Glycomics (Atlanta, GA) konnte

für *PpCcw14A* und *ScCcw14A* eine Interaktion zu endständigen Gal- β -1,3-GlcNAc aufzeigen (Anhang 7.1).

5.6 Die Oligomerisierung von Pga7-Orthologen als funktionelles Motiv

Größenausschlusschromatografische Aufreinigungen für *CaPga7* und *CaRbt5* haben gezeigt, dass die häminbindende Spezies in multimerer Form vorliegt. Die Rekonstruktion benachbarter asymmetrischer Zellen der *CaCsa2*-Struktur zeigt einen Schichtenaufbau, mit einem repetitiven Muster des gebundenen Hämins (Abbildung 70A,B). Diese Kristallpackung beruht dabei auf intermolekularen Wechselwirkungen der α -Helices und nicht auf Hämin-Hämin-Interaktionen. Da die Abstände zwischen den einzelnen Porphyrinringsystemen zwischen 25 -30 Å betragen, sind diese damit zu weit voneinander entfernt um miteinander zu wechselwirken. Die Kristallpackung muss jedoch nicht der oligomeren, aktiven Spezies in wässriger Lösung entsprechen. Ein Beispiel für eine positive Stapelung kann bei Hemozoin, der kristallinen Form des Hämins, gezeigt werden (Abbildung 70C)²¹⁶.

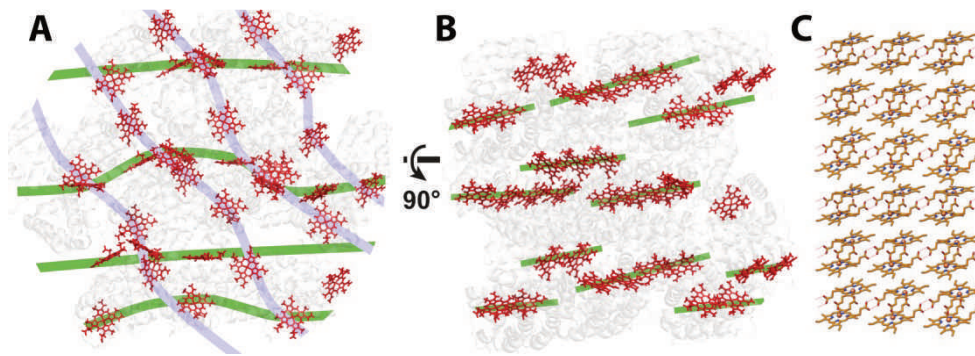
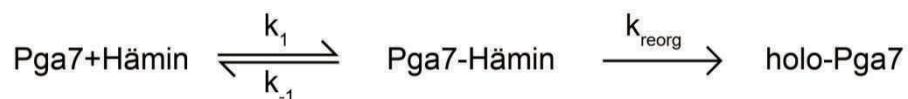


Abbildung 70A, B): Die Rekonstruktion benachbarter asymmetrischer Einheitszellen von *CaCsa2* (PDB-Code: 4Y7S) zeigt einen Schichtenaufbau für das gebundene Hämin. C) Zeigt Hemozoin, die kristalline Form des Hämins²¹⁶.

Da bisher keine apo-*CaCsa2* Struktur kristallisiert werden konnte, scheint die Fixierung des N-Terminus oberhalb des Hämins für die Kristallisation notwendig zu. Dies würde zusätzlich bedeuten, dass in der ungebundenen *CaCsa2*-Form, der N-Terminus flexibel vorliegt und dadurch eine intermolekulare Anlagerung der α -Helizes behindert. Folglich würde nach einer Bindung der N-Terminus das Hämin deckelartig vor Solvent abschirmen und im Anschluss daran könnte über die α -Helizes eine Oligomerisierung erfolgen. Ein vergleichbares Hämin-Oligomerisierungsverhalten, bei dem das apo-Protein als Monomer und das holo-Protein als Multimer vorliegt, kann bei MmpL3 aus *Mycobacterium tuberculosis* oder ChaN aus *C. jejuni* beobachtet werden^{218,219}

5.7 Zeitabhängige Bindung von Pga7-Orthologen an Hämin-B

Die Bindung von *CaPga7* oder *CaRbt5* an Hämin-B kann über einen klassischen zweistufigen Prozess beschrieben werden. Dabei erfolgt im ersten Schritt die Ausbildung eines intermediären Protein-Hämin-Komplexes. Im Folgenden kommt es zu einer strukturellen Umlagerung des flexiblen N-Terminus und der damit einhergehenden Reorganisierung der hydrophoben Bindungsstelle, in der das Hämin final gebunden vorliegt. Dieses Modell beschreibt den einfachsten Fall eines zweistufigen Prozesses (Formel 5.7). Für komplexere Oligomerisierungsreaktionen kann die Geschwindigkeitskonstante k_{reorg} zusätzlich in $k_{1\text{reorg}}$, $k_{2\text{reorg}}$, $k_{3\text{reorg}}$, usw. aufgespalten werden.



Formel 5.7: Die Bindung von Pga7-Orthologen an Hämin-B kann mithilfe eines zweistufigen Mechanismus beschrieben werden. Zuerst erfolgt die Ausbildung eines intermediären Protein-Hämin-Komplexes (k_1). Nach einer strukturellen Reorganisierung innerhalb der Bindungstasche erfolgt die Ausbildung von holo-Pga7 (k_{reorg}).

Ein ähnliches Schema kann für andere Häminbindende-Proteinen, wie beispielsweise MmpL aus *Mycobacterium tuberculosis* beobachtet werden²²⁰.

Die UV/Vis-spektroskopische Untersuchung der zeitabhängigen Bindung von Hämin-B durch *CaPga7* sowie *CaRbt5* zeigt Unterschiede in der zeitlichen Bildungsrate für die Formierung von holo-*CaPga7* und holo-*CaRbt5*. Über den Mittelpunkt (x_0) der verwendeten logistischen Funktion kann zwar eine Abschätzung zu den Bildungsgeschwindigkeiten zwischen einander getroffen werden, ohne jedoch direkte Rückschlüsse zu On-/ Off-Raten liefern zu können. In diesem Fall müssen weitere konzentrationsabhängige Messungen durchgeführt werden. Dies ist notwendig, da über die On-/Off-Raten, unter anderem die derzeit noch offene Fragestellung, wie die Extraktion des Hämins aus Hämoglobin möglich ist, trotz der geringeren Bindungskonstanten der Pga7-Orthologen. Um einen Überblick zu Bindungskonstanten anderer häminbindender Proteinen zu erhalten, sind in folgender Tabelle ausgewählte Vertreter zusammengestellt.

Tabelle 5.7: Auflistung von Bindungskonstanten literaturbekannter, häminbindender Proteine mit der Angabe von K_{on} , K_{off} und K_a . Abgeändert nach OWENS *et al.* ²¹⁹.

	On-Rate / $\mu\text{M}\cdot\text{s}$	Off-Rate /s	K_a /M
<i>CaPga7</i> ⁴⁴	-	-	$1.5\cdot 10^7$
<i>CaRbt5</i> ⁴⁴	-	-	$1.8\cdot 10^5$
<i>MmpL3</i> ²¹⁹	53 ± 18	0.34 ± 0.02	$8.1\cdot 10^9$
<i>Rv0203</i> ¹⁹⁰	133	0.08	$1.6\cdot 10^9$
metHb (α -Untereinheit) ²²¹	100	0.00016	$6.01\cdot 10^{11}$
metHb (β -Untereinheit) ²²¹	100	0.0042	$2.4\cdot 10^{10}$
<i>IsdA</i> ²²²	100	0.00026	$3.8\cdot 10^{11}$
<i>PhuS</i> ²²³	0.18	0.04	$5.0\cdot 10^6$
<i>Shp</i> ²²⁴	1.6	0.0003	$5.3\cdot 10^6$

5.8 Ausblick zu CFEM-Proteinen

In dieser Arbeit konnte die CFEM-Proteinfamilie, die über 2000 Proteinsequenzen in der Interpro-Dankenbank aufweist, in distinkte Gruppen eingeteilt werden. Für Pga7- und Ccw14-Orthologe konnte gezeigt werden, dass diese distinkten Gruppen eigene Funktionen erfüllen und damit die CFEM-Domäne nicht nur eine spezifische Funktion zeigt (Abbildung 71). Cfma und Ccw14-Orthologe sind bei der Remodellierung der pilzlichen Zellwand beteiligt, wobei für Ccw14 durch ein *Glycan array screening* eine zusätzliche Bindungsaktivität für endständige Gal- β -1,3-Glykane gezeigt werden konnte (Anhang 7.1). Wegen der Humanpathogen spezifischen Zusammensetzung dieses *arrays* sind weitere Bindungsuntersuchungen mit komplexen Glykanstrukturen notwendig. Neben den in dieser Arbeit thematisierten Gruppen, stellen Pth11-Orthologe eine besonders interessante Gruppierung dar, da hier die N-terminale CFEM-Domäne als Sensordomäne präsentieren. Darüber

hinaus ist die Shuffle-Region ausgesprochen interessant, da hier sehr unterschiedliche Domänenarchitekturen zusammenfallen.

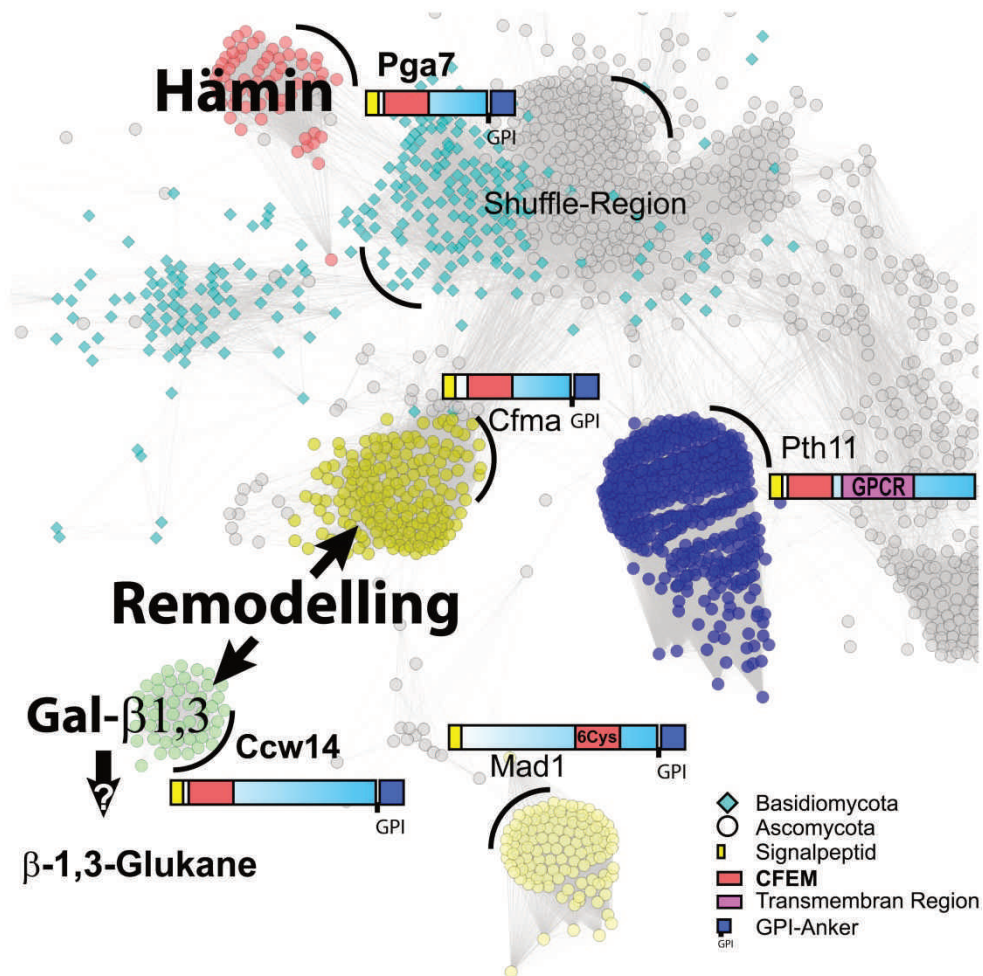


Abbildung 71: Phylogenetische Untersuchung mittels EFI-EST-SSN ($E\text{-value} = 5$, $fraction = 1$, domain off, $alignment\ score = 6$, Gruppierung = 90 %) von CFEM-Proteinen anhand von 2020 Sequenzen aus der Interpro Datenbank (IPR008427). Einteilung der Cluster anhand prominenter Vertreter, Pth11 (blau), Pga7 (rot), Cfma (gelb), Mad1 (beige), Ccw14 (türkis) mit zusätzlicher Unterscheidung anhand der Phyla *Ascomycota* (Kreis) und *Basidiomycota* (Raute). Nicht zugeordnete Sequenzen sind in grau gezeigt. Zusätzlich sind die Domänenorganisationen für die jeweiligen Cluster mit aufgezeigt.

6 Literaturverzeichnis

- 1 Castillon, G. A. *et al.* The yeast p24 complex regulates GPI-anchored protein transport and quality control by monitoring anchor remodeling. *Mol Biol Cell* **22**, 2924-2936 (2011).
- 2 Puertas, A., Dueñas, M. & Marieta, C. Supramolecular Structure and Renaturation of a (1→3)-β-d-Glucan Compared with Curdlan and Scleroglucan. *Fibers* **2**, 255 (2014).
- 3 Xiao, M. *et al.* Investigation on curdlan dissociation by heating in water. *Food Hydrocolloids* **70**, 57-64 (2017).
- 4 Sletmoen, M. & Stokke, B. T. Higher order structure of (1,3)-beta-D-glucans and its influence on their biological activities and complexation abilities. *Biopolymers* **89**, 310-321 (2008).
- 5 Hawksworth, D. L. The Fungal Dimension of Biodiversity - Magnitude, Significance, and Conservation. *Mycol Res* **95**, 641-655 (1991).
- 6 Hawksworth, D. L. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycol Res* **105**, 1422-1432 (2001).
- 7 Hibbett, D. S. & Donoghue, M. J. Implications of phylogenetic studies for conservation of genetic diversity in shiitake mushrooms. *Conserv Biol* **10**, 1321-1327 (1996).
- 8 Shvarts, E. S., Popova, L. V. & Chernova, N. M. Dynamics of saprobiont group in various fractions of forest litterfall. *Zool Zh* **78**, 1424-1433 (1999).
- 9 Thompson, J. N. Coevolution: The geographic mosaic of coevolutionary arms races. *Curr Biol* **15**, R992-R994 (2005).
- 10 Brown, G. D. *et al.* Hidden Killers: Human Fungal Infections. *Sci Transl Med* **4**, 130-135 (2012).
- 11 Brown, G. D., Denning, D. W. & Levitz, S. M. Tackling Human Fungal Infections. *Science* **336**, 647-647 (2012).
- 12 Hyodo, F., Inoue, T., Azuma, J. I., Tayasu, I. & Abe, T. Role of the mutualistic fungus in lignin degradation in the fungus-growing termite *Macrotermes gilvus* (Isoptera; Macrotermitinae). *Soil Biol Biochem* **32**, 653-658 (2000).
- 13 Graham, L. E. The Origin of the Life-Cycle of Land Plants. *Am Sci* **73**, 178-186 (1985).
- 14 Abad, A. *et al.* What makes *Aspergillus fumigatus* a successful pathogen? Genes and molecules involved in invasive aspergillosis. *Revista iberoamericana de micologia* **27**, 155-182 (2010).
- 15 Gow, N. A. R. Fungal genomics: Forensic evidence of sexual activity. *Curr Biol* **15**, R509-R511 (2005).
- 16 Latge, J. P. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev* **12**, 310-325 (1999).
- 17 Hebart, H. *et al.* T-cell responses to *Aspergillus fumigatus* antigens in healthy individuals and patients with hematological malignancies. *Blood* **94**, 641a-641a (1999).
- 18 Weissman, Z. & Kornitzer, D. A family of *Candida* cell surface haem-binding proteins involved in haemin and haemoglobin-iron utilization. *Molecular microbiology* **53**, 1209-1220 (2004).
- 19 Al-Fattani, M. A. & Douglas, L. J. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. *J Med Microbiol* **55**, 999-1008 (2006).
- 20 Lopez-Ribot, J. L. Large-Scale Biochemical Profiling of the *Candida albicans* Biofilm Matrix: New Compositional, Structural, and Functional Insights. *Mol Bio* **5** (2014).
- 21 Alem, M. A. S., Oteef, M. D. Y., Flowers, T. H. & Douglas, L. J. Production of tyrosol by *Candida albicans* biofilms and its role in quorum sensing and biofilm development. *Eukaryotic cell* **5**, 1770-1779 (2006).
- 22 Fox, E. P. *et al.* Anaerobic Bacteria Grow within *Candida albicans* Biofilms and Induce Biofilm Formation in Suspension Cultures. *Curr Biol* **24**, 2411-2416 (2014).

- 23 Martini, A. Origin and domestication of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Wine Research* **4**, 165-176 (1993).
- 24 Mortimer, R. K. Evolution and variation of the yeast (*Saccharomyces*) genome. *Genome research* **10**, 403-409 (2000).
- 25 Schacherer, J. *et al.* Genome-Wide Analysis of Nucleotide-Level Variation in Commonly Used *Saccharomyces cerevisiae* Strains. *PloS one* **2** (2007).
- 26 Nomura, M., Nakamori, S. & Takagi, H. Characterization of novel acetyltransferases found in budding and fission yeasts that detoxify a proline analogue, azetidine-2-carboxylic acid. *J Biochem* **133**, 67-74 (2003).
- 27 Cabib, E., Bowers, B., Sburlati, A. & Silverman, S. J. Fungal Cell-Wall Synthesis - the Construction of a Biological Structure. *Microbiological sciences* **5**, 370-375 (1988).
- 28 Maestre-Reyna, M. *et al.* Structural basis for promiscuity and specificity during *Candida glabrata* invasion of host epithelia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 16864-16869 (2012).
- 29 Okawa, Y., Miyauchi, M., Goto, K. & Giummelly, P. Antigenicity of cell wall mannans of *Candida albicans* NIH A-207 strain cells cultured in galactose-added yeast nitrogen base medium. *Biol Pharm Bull* **28**, 391-393 (2005).
- 30 de Groot, P. W., Bader, O., de Boer, A. D., Weig, M. & Chauhan, N. Adhesins in human fungal pathogens: glue with plenty of stick. *Eukaryotic cell* **12**, 470-481 (2013).
- 31 Gastebois, A., Clavaud, C., Aïmanianda, V. & Latge, J. P. *Aspergillus fumigatus*: cell wall polysaccharides, their biosynthesis and organization. *Future microbiology* **4**, 583-595 (2009).
- 32 Latge, J. P. *et al.* Chemical and Immunological Characterization of the Extracellular Galactomannan of *Aspergillus-Fumigatus*. *Infection and immunity* **62**, 5424-5433 (1994).
- 33 Erwig, L. P. & Gow, N. A. R. Interactions of fungal pathogens with phagocytes. *Nature Reviews Microbiology* **14**, 163-176 (2016).
- 34 Mogilevskaya, E. L., Akopova, T. A., Zelenetskii, A. N. & Ozerin, A. N. The crystal structure of chitin and chitosan. *Polym Sci Ser a+* **48**, 116-123 (2006).
- 35 Hanashima, S. *et al.* NMR study of short beta(1-3)-glucans provides insights into the structure and interaction with Dectin-1. *Glycoconjugate journal* **31**, 199-207 (2014).
- 36 Tada, T., Tamai, N., Matsumoto, T. & Masuda, T. Network structure of curdlan in DMSO and mixture of DMSO and water. *Biopolymers* **58**, 129-137 (2001).
- 37 Friedlaender, M. H., Cook, W. H. & Martin, W. G. Molecular weight and hydrodynamic properties of laminarin. *Biochimica et biophysica acta* **14**, 136-144 (1954).
- 38 Sakurai, K. *et al.* beta-1,3-glucan polysaccharides as novel one-dimensional hosts for DNA/RNA, conjugated polymers and nanoparticles. *Chem Commun*, 4383-4398 (2005).
- 39 Young, S. H., Dong, W. J. & Jacobs, R. R. Observation of a partially opened triple-helix conformation in 1 -> 3-beta-glucan by fluorescence resonance energy transfer spectroscopy. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 11874-11879 (2000).
- 40 Leung, M. Y. K., Liu, C., Koon, J. C. M. & Fung, K. P. Polysaccharide biological response modifiers. *Immunol Lett* **105**, 101-114 (2006).
- 41 Lenardon, M. D., Munro, C. A. & Gow, N. A. R. Chitin synthesis and fungal pathogenesis. *Curr Opin Microbiol* **13**, 416-423 (2010).
- 42 Baker, L. G., Specht, C. A., Donlin, M. J. & Lodge, J. K. Chitosan, the deacetylated form of chitin, is necessary for cell wall integrity in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic cell* **6**, 855-867 (2007).
- 43 Goto, H., Furusho, Y. & Yashima, E. Supramolecular control of unwinding and rewinding of a double helix of oligoresorcinol using cyclodextrin/adamantane system. *J Am Chem Soc* **129**, 109-112 (2007).

-
- 44 Kuznets, G. *et al.* A relay network of extracellular heme-binding proteins drives *C. albicans* iron acquisition from hemoglobin. *PLoS pathogens* **10**, e1004407 (2014).
- 45 Gastebois, A. *et al.* SUN proteins belong to a novel family of beta-(1,3)-glucan-modifying enzymes involved in fungal morphogenesis. *The Journal of biological chemistry* **288**, 13387-13396 (2013).
- 46 Martchenko, M., Alarco, A. M., Marcus, D. & Whiteway, M. Superoxide dismutases in *Candida albicans*: Transcriptional regulation and functional characterization of the hyphal-induced SOD5 gene. *Mol Biol Cell* **15**, 456-467 (2004).
- 47 Martinez, A. I. *et al.* Role of Pir1 in the construction of the *Candida albicans* cell wall. *Microbiol-Sgm* **150**, 3151-3161 (2004).
- 48 Wang, Q. J., Li, L., Chen, M., Qi, Q. S. & Wang, P. G. Construction of a novel *Pichia pastoris* cell-surface display system based on the cell wall protein pir1. *Curr Microbiol* **56**, 352-357 (2008).
- 49 Klis, F. M. & Brul, S. Adaptations of the Secretome of *Candida albicans* in Response to Host-Related Environmental Conditions. *Eukaryotic cell* **14**, 1165-1172 (2015).
- 50 Camougrand, N. M., Mouassite, M., Velours, G. M. & Guerin, M. G. The "SUN" family: UTH1, an ageing gene, is also involved in the regulation of mitochondria biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of biochemistry and biophysics* **375**, 154-160 (2000).
- 51 Ritch, J. J., Davidson, S. M., Sheehan, J. J. & Austriaco, O. P. N. The *Saccharomyces* SUN gene, UTH1, is involved in cell wall biogenesis. *FEMS yeast research* **10**, 168-176 (2010).
- 52 Kuznetsov, E., Plocek, V., Palkova, Z. & Vachova, L. Sun family proteins Sim1p, Uth1p and Sun4p are secreted by *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **30**, 151-151 (2013).
- 53 Mouassite, M. *et al.* The 'SUN' family: yeast SUN4/SCW3 is involved in cell septation. *Yeast* **16**, 905-919 (2000).
- 54 Dogan, R. I. *et al.* The BioC-BioGRID corpus: full text articles annotated for curation of protein-protein and genetic interactions. *Database-Oxford* (2017).
- 55 Chatr-aryamontri, A. *et al.* The BioGRID interaction database: 2017 update. *Nucleic acids research* **45**, D369-D379 (2017).
- 56 Jorgensen, A. L. W., Juul-Madsen, H. R. & Stagsted, J. A novel, simple and sensitive ligand affinity capture method for detecting molecular interactions by MALDI mass spectrometry. *J Mass Spectrom* **44**, 338-345 (2009).
- 57 Wanless, A. G., Lin, Y. & Weiss, E. L. Cell Morphogenesis Proteins Are Translationally Controlled through UTRs by the Ndr/LATS Target Ssd1. *PloS one* **9** (2014).
- 58 Uesono, Y., Tohe, A. & Kikuchi, Y. Ssd1p of *Saccharomyces cerevisiae* associates with RNA. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 16103-16109 (1997).
- 59 Jansen, J. M., Wanless, A. G., Seidel, C. W. & Weiss, E. L. Cbk1 Regulation of the RNA-Binding Protein Ssd1 Integrates Cell Fate with Translational Control. *Curr Biol* **19**, 2114-2120 (2009).
- 60 Gastebois, A. *et al.* Characterization of a new beta(1-3)-glucan branching activity of *Aspergillus fumigatus*. *The Journal of biological chemistry* **285**, 2386-2396 (2010).
- 61 Norice, C. T., Smith, F. J., Solis, N., Filler, S. G. & Mitchell, A. P. Requirement for *Candida albicans* sun41 in biofilm formation and virulence. *Eukaryotic cell* **6**, 2046-2055 (2007).
- 62 Omi, K., Sonoda, H., Nagata, K. & Sugita, K. Cloning and characterization of *psu1(+)*, a new essential fission yeast gene involved in cell wall synthesis. *Biochem Bioph Res Co* **262**, 368-374 (1999).
- 63 Kuznetsov, E., Vachova, L. & Palkova, Z. Cellular localization of Sun4p and its interaction with proteins in the yeast birth scar. *Cell cycle* **15**, 1898-1907 (2016).

-
- 64 Ratcliff, W. C., Fankhauser, J. D., Rogers, D. W., Greig, D. & Travisano, M. Origins of multicellular evolvability in snowflake yeast. *Nat Commun* **6**, 6102 (2015).
- 65 Weiss, E. L. Mitotic Exit and Separation of Mother and Daughter Cells. *Genetics* **192**, 1165-1202 (2012).
- 66 Cappellaro, C., Mersa, V. & Tanner, W. New potential cell wall glucanases of *Saccharomyces cerevisiae* and their involvement in mating. *J Bacteriol* **180**, 5030-5037 (1998).
- 67 Skory, C. D. & Freer, S. N. Cloning and Characterization of a Gene Encoding a Cell-Bound, Extracellular Beta-Glucosidase in the Yeast *Candida Wickerhamii*. *Applied and environmental microbiology* **61**, 518-525 (1995).
- 68 Yu, M. N. *et al.* Identification of pathogenicity-related genes in the rice pathogen *Ustilago indica* through random insertional mutagenesis. *Fungal Genetics and Biology* **76**, 10-19 (2015).
- 69 Kulkarni, R. D., Kelkar, H. S. & Dean, R. A. An eight-cysteine-containing CFEM domain unique to a group of fungal membrane proteins. *Trends in biochemical sciences* **28**, 118-121 (2003).
- 70 Choi, W. & Dean, R. A. The adenylate cyclase gene *MAC1* of *Magnaporthe grisea* controls appressorium formation and other aspects of growth and development. *The Plant cell* **9**, 1973-1983 (1997).
- 71 Nasser, L. *et al.* Structural basis of haem-iron acquisition by fungal pathogens. *Nat Microbiol* **1** (2016).
- 72 Protchenko, O. *et al.* Role of *PUG1* in inducible porphyrin and heme transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic cell* **7**, 859-871 (2008).
- 73 Yun, C. W. *et al.* Desferrioxamine-mediated iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae* - Evidence for two pathways of iron uptake. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 10709-10715 (2000).
- 74 Yun, C. W., Tiedeman, J. S., Moore, R. E. & Philpott, C. C. Siderophore-iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae* - Identification of ferrichrome and fusarinine transporters. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 16354-16359 (2000).
- 75 Garcera, A. *et al.* Identification and study of a *Candida albicans* protein homologous to *Saccharomyces cerevisiae* *Ssr1p*, an internal cell-wall protein. *Microbiol-Sgm* **149**, 2137-2145 (2003).
- 76 Moukadiri, I., Armero, J., Abad, A., Sentandreu, R. & Zueco, J. Identification of a mannoprotein present in the inner layer of the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **179**, 2154-2162 (1997).
- 77 Kulkarni, R. D., Thon, M. R., Pan, H. & Dean, R. A. Novel G-protein-coupled receptor-like proteins in the plant pathogenic fungus *Magnaporthe grisea*. *Genome biology* **6**, R24 (2005).
- 78 DeZwaan, T. M., Carroll, A. M., Valent, B. & Sweigard, J. A. *Magnaporthe grisea* *pth11p* is a novel plasma membrane protein that mediates appressorium differentiation in response to inductive substrate cues. *The Plant cell* **11**, 2013-2030 (1999).
- 79 Elion, E. A. Pheromone response, mating and cell biology. *Curr Opin Microbiol* **3**, 573-581 (2000).
- 80 Dean, R. A. Signal pathways and appressorium morphogenesis. *Annu Rev Phytopathol* **35**, 211-234 (1997).
- 81 Vaknin, Y. *et al.* The three *Aspergillus fumigatus* CFEM-domain GPI-anchored proteins (*CfmA-C*) affect cell-wall stability but do not play a role in fungal virulence. *Fungal Genetics and Biology* **63**, 55-64 (2014).
- 82 Linding, R., Russell, R. B., Neduva, V. & Gibson, T. J. GlobPlot: Exploring protein sequences for globularity and disorder. *Nucleic acids research* **31**, 3701-3708 (2003).

-
- 83 McGuffin, L. J., Bryson, K. & Jones, D. T. The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics* **16**, 404-405 (2000).
- 84 Schwede, T., Kopp, J., Guex, N. & Peitsch, M. C. SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server. *Nucleic acids research* **31**, 3381-3385 (2003).
- 85 Bordoli, L. & Schwede, T. Automated protein structure modeling with SWISS-MODEL Workspace and the Protein Model Portal. *Methods in molecular biology* **857**, 107-136 (2012).
- 86 Biasini, M. *et al.* SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic acids research* **42**, W252-258 (2014).
- 87 Lambo, J. A. *Functional and structural research of SUN4 protein variants from Saccharomyces cerevisiae, Candida glabrata and candida albicans*. diploma thesis, Philipps-Universität Marburg, (2010).
- 88 Kalugin, V. *CFEM-Domäne : Charakterisierung einer neuartigen, pilzspezifischen, cysteinreichen Domäne*. master thesis, Philipps-Universität Marburg, (2012).
- 89 Veelders, M. *Flokkuline aus Saccharomyces cerevisiae: funktionelle und strukturelle Untersuchungen* Dr. rer. nat thesis, Philipps-Universität Marburg, (2008).
- 90 Klingler, J. & Tschierpe, H. J. Effect of Saprobiont Nematodes on the Yield of Cultivated Mushroom. *Z Pflanzenk Pflanzen* **87**, 121-124 (1980).
- 91 Finet, C., Timme, R. E., Delwiche, C. F. & Marleta, F. Multigene Phylogeny of the Green Lineage Reveals the Origin and Diversification of Land Plants. *Curr Biol* **20**, 2217-2222 (2010).
- 92 Zhang, Z. *et al.* Overexpression of DsbC and DsbG markedly improves soluble and functional expression of single-chain Fv antibodies in Escherichia coli. *Protein expression and purification* **26**, 218-228 (2002).
- 93 Poirot, O., O'Toole, E. & Notredame, C. Tcoffee@igs: A web server for computing, evaluating and combining multiple sequence alignments. *Nucleic acids research* **31**, 3503-3506 (2003).
- 94 Notredame, C., Higgins, D. G. & Heringa, J. T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *Journal of molecular biology* **302**, 205-217 (2000).
- 95 Taly, J. F. *et al.* Using the T-Coffee package to build multiple sequence alignments of protein, RNA, DNA sequences and 3D structures. *Nature protocols* **6**, 1669-1682 (2011).
- 96 Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. & Kumar, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular biology and evolution* **30**, 2725-2729 (2013).
- 97 Le, S. Q., Lartillot, N. & Gascuel, O. Phylogenetic mixture models for proteins. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* **363**, 3965-3976 (2008).
- 98 Whelan, S. & Goldman, N. A general empirical model of protein evolution derived from multiple protein families using a maximum-likelihood approach. *Molecular biology and evolution* **18**, 691-699 (2001).
- 99 Zhou, Y. P. *et al.* Biosynthetic origin of the saw-toothed profile in delta(13) C and delta H-2 of n-alkanes and systematic isotopic differences between n-, iso- and anteiso-alkanes in leaf waxes of land plants. *Phytochemistry* **71**, 388-403 (2010).
- 100 Gerlt, J. A. *et al.* Enzyme Function Initiative-Enzyme Similarity Tool (EFI-EST): A web tool for generating protein sequence similarity networks. *Biochimica et biophysica acta* **1854**, 1019-1037 (2015).
- 101 Shannon, P. *et al.* Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome research* **13**, 2498-2504 (2003).
- 102 Dror, R. O., Dirks, R. M., Grossman, J. P., Xu, H. & Shaw, D. E. Biomolecular simulation: a computational microscope for molecular biology. *Annual review of biophysics* **41**, 429-452 (2012).

-
- 103 D.A. Case, V. B., J.T. Berryman, R.M. Betz, Q. Cai, D.S. Cerutti, T.E. Cheatham, III, T.A. Darden, R.E. Duke, H. Gohlke, A.W. Goetz, S. Gusarov, N. Homeyer, P. Janowski, J. Kaus, I. Kolossváry, A. Kovalenko, T.S. Lee, S. LeGrand, T. Luchko, R. Luo, B. Madej, K.M. Merz, F. Paesani, D.R. Roe, A. Roitberg, C. Sagui, R. Salomon-Ferrer, G. Seabra, C.L. Simmerling, W. Smith, J. Swails, R.C. Walker, J. Wang, R.M. Wolf, X. Wu and P.A. Kollman AMBER 14, University of California, San Francisco. (2014).
- 104 Kirschner, K. N. *et al.* GLYCAM06: A generalizable Biomolecular force field. *Carbohydrates. Journal of computational chemistry* **29**, 622-655 (2008).
- 105 Humphrey, W., Dalke, A. and Schulten, K. VMD - Visual Molecular Dynamics. *Journal of molecular graphics* **14**, 33-38 (1996).
- 106 Mullis, K. B. & Faloona, F. A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in enzymology* **155**, 335-350 (1987).
- 107 Miyashira, C. H., Tanigushi, D. G., Gugliotta, A. M. & Santos, D. Y. A. C. Comparison of Radial Growth Rate of the Mutualistic Fungus of *Atta Sexdens Rubropilosa* Forel in Two Culture Media. *Braz J Microbiol* **41**, 506-511 (2010).
- 108 Kenrick, P. & Graham, L. K. E. The origin of alternation of generations in land plants: a focus on matrotrophy and hexose transport - Discussion. *Philos T Roy Soc B* **355**, 766-767 (2000).
- 109 Ferwerda, B. *et al.* Human Dectin-1 Deficiency and Mucocutaneous Fungal Infections. *New Engl J Med* **361**, 1760-1767 (2009).
- 110 Inoue, H., Nojima, H. & Okayama, H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**, 23-28 (1990).
- 111 Kilts, C. D. *et al.* The neural correlates of social anxiety disorder and response to pharmacotherapy. *Neuropsychopharmacol* **31**, 2243-2253 (2006).
- 112 Kilts, C. D. *et al.* The neural correlates of social anxiety disorder and response to pharmacotherapy (vol 31, pg 2254, 2006). *Neuropsychopharmacol* **31**, 2254-2254 (2006).
- 113 Patel, R. S., Bowman, F. D. & Rilling, J. K. A Bayesian approach to determining connectivity of the human brain. *Hum Brain Mapp* **27**, 267-276 (2006).
- 114 Saijo, S. *et al.* Dectin-2 Recognition of alpha-Mannans and Induction of Th17 Cell Differentiation Is Essential for Host Defense against *Candida albicans*. *Immunity* **32**, 681-691 (2010).
- 115 Soumya, R. S. & Abraham, E. T. Isolation of beta-mannanase from *Cocos nucifera* Linn haustorium and its application in the depolymerization of beta-(1,4)-linked d-mannans. *Int J Food Sci Nutr* **61**, 272-281 (2010).
- 116 Rillahan, C. D. & Paulson, J. C. Glycan microarrays for decoding the glycome. *Annual review of biochemistry* **80**, 797-823 (2011).
- 117 Moller, I. *et al.* High-throughput mapping of cell-wall polymers within and between plants using novel microarrays. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **50**, 1118-1128 (2007).
- 118 Garbett, N. C. & Chaires, J. B. Thermodynamic studies for drug design and screening. *Expert opinion on drug discovery* **7**, 299-314 (2012).
- 119 Manuel, M.-R. *Structural and functional studies of mucin-interacting adhesion domains from Candida glabrata & Helicobacter pylori* Dr. rer. nat thesis, Philipps-Universität Marburg, (2011).
- 120 Vega, S., Abian, O. & Velazquez-Campoy, A. On the link between conformational changes, ligand binding and heat capacity. *Biochimica et biophysica acta* **1860**, 868-878 (2016).
- 121 Falconer, R. J. Applications of isothermal titration calorimetry - the research and technical developments from 2011 to 2015. *Journal of molecular recognition. JMR* **29**, 504-515 (2016).

-
- 122 Nakamura, R. *et al.* A plasma-polymerized film for surface plasmon resonance immunosensing. *Analytical chemistry* **69**, 4649-4652 (1997).
 - 123 Myszka, D. G. Analysis of small-molecule interactions using Biacore S51 technology. *Analytical biochemistry* **329**, 316-323 (2004).
 - 124 Mitchell, J. Small molecule immunosensing using surface plasmon resonance. *Sensors* **10**, 7323-7346 (2010).
 - 125 Healthcare, G. *Biacore T100 Software Handbook*. (Februar 2006).
 - 126 Englander, S. W., Mayne, L., Bai, Y. & Sosnick, T. R. Hydrogen exchange: the modern legacy of Linderstrom-Lang. *Protein science : a publication of the Protein Society* **6**, 1101-1109 (1997).
 - 127 Englander, S. W. & Kallenbach, N. R. Hydrogen exchange and structural dynamics of proteins and nucleic acids. *Quarterly reviews of biophysics* **16**, 521-655 (1983).
 - 128 Maier, C. S. & Deinzer, M. L. Protein conformations, interactions, and H/D exchange. *Methods in enzymology* **402**, 312-360 (2005).
 - 129 *Froschembryo*, www.poisondartfrogbreeding.weebly.com/egg-and-tadpole-care (04.2017)
 - 130 *plant cell*, www.biology.arizona.edu (04.2017)
 - 131 *stem cells*, <https://med.stanford.edu/stem-cells-police-themselves-to-reduce-scarring-study-finds.html> (04.2017)
 - 132 Ramasamy, M. D. M. a. P. in *Modern Electron Microscopy in Physical and Life Sciences*, Ch. 8, (2016).
 - 133 Cassone, A. Development of vaccines for *Candida albicans*: fighting a skilled transformer. *Nature reviews. Microbiology* **11**, 884-891 (2013).
 - 134 *elementary particles*, www.abyss.uoregon.edu/21st_century_science/lec16.html (04.2017)
 - 135 Kikhney, A. G. & Svergun, D. I. A practical guide to small angle X-ray scattering (SAXS) of flexible and intrinsically disordered proteins. *FEBS letters* **589**, 2570-2577 (2015).
 - 136 Spinozzi, F. *et al.* Quaternary structure heterogeneity of oligomeric proteins: a SAXS and SANS study of the dissociation products of Octopus vulgaris hemocyanin. *PloS one* **7**, e49644 (2012).
 - 137 Jimenez-Garcia, B., Pons, C., Svergun, D. I., Bernado, P. & Fernandez-Recio, J. pyDockSAXS: protein-protein complex structure by SAXS and computational docking. *Nucleic acids research* **43**, W356-361 (2015).
 - 138 Qin, P., Yu, D., Zuo, X. & Cornish, P. V. Structured mRNA induces the ribosome into a hyper-rotated state. *EMBO reports* **15**, 185-190 (2014).
 - 139 Wang, A. C. *et al.* An efficient triple-resonance experiment for proton-directed sequential backbone assignment of medium-sized proteins. *Journal of magnetic resonance. Series B* **105**, 196-198 (1994).
 - 140 Grzesiek, S. *et al.* ¹H, ¹³C, and ¹⁵N NMR backbone assignments and secondary structure of human interferon-gamma. *Biochemistry* **31**, 8180-8190 (1992).
 - 141 Berman, H. M. *et al.* The Protein Data Bank. *Nucleic acids research* **28**, 235-242 (2000).
 - 142 Schmidt, A., Teeter, M., Weckert, E. & Lamzin, V. S. Crystal structure of small protein crambin at 0.48 Å resolution. *Acta crystallographica. Section F, Structural biology and crystallization communications* **67**, 424-428 (2011).
 - 143 Hirano, Y., Takeda, K. & Miki, K. Charge-density analysis of an iron-sulfur protein at an ultra-high resolution of 0.48 Å. *Nature* **534**, 281-284 (2016).
 - 144 Chruszcz, M. *et al.* Analysis of solvent content and oligomeric states in protein crystals-does symmetry matter? *Protein science : a publication of the Protein Society* **17**, 623-632 (2008).
 - 145 Dasgupta, S., Iyer, G. H., Bryant, S. H., Lawrence, C. E. & Bell, J. A. Extent and nature of contacts between protein molecules in crystal lattices and between subunits of protein oligomers. *Proteins* **28**, 494-514 (1997).

-
- 146 Chayen, N. E. & Saridakis, E. Protein crystallization: from purified protein to diffraction-
quality crystal. *Nature methods* **5**, 147-153 (2008).
- 147 Newman, J. *et al.* Towards rationalization of crystallization screening for small- to medium-
sized academic laboratories: the PACT/JCSG+ strategy. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **61**, 1426-1431 (2005).
- 148 Jarmila Jancarik, S.-H. K. Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of
proteins. *Journal of applied crystallography*, 409-411 (1991).
- 149 Bergfors, T. Seeds to crystals. *Journal of structural biology* **142**, 66-76 (2003).
- 150 W. H. Bragg, W. L. B. The Reflection of X-rays by Crystals. *Proceedings of the Royal Society A*
88, 11 (1913).
- 151 Drenth, J. *Principles of Protein X-Ray Crystallography*. Vol. Third Edition 332 (Springer,
2007).
- 152 Battye, T. G., Kontogiannis, L., Johnson, O., Powell, H. R. & Leslie, A. G. iMOSFLM: a
new graphical interface for diffraction-image processing with MOSFLM. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **67**, 271-281 (2011).
- 153 Evans, P. Scaling and assessment of data quality. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **62**, 72-82 (2006).
- 154 Kabsch, W. Integration, scaling, space-group assignment and post-refinement. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **66**, 133-144 (2010).
- 155 Collaborative Computational Project, N. The CCP4 suite: programs for protein
crystallography. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **50**, 760-763
(1994).
- 156 Kendrew, J. C. *et al.* Structure of myoglobin: A three-dimensional Fourier synthesis at 2 Å.
resolution. *Nature* **185**, 422-427 (1960).
- 157 Patterson, A. L. A Fourier Series Method for the Determination of the Components of
Interatomic Distances in Crystals. *Physical Review* **46**, 5 (1934).
- 158 Lebedev, A. A., Vagin, A. A. & Murshudov, G. N. Model preparation in MOLREP and
examples of model improvement using X-ray data. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **64**, 33-39 (2008).
- 159 Vagin, A. & Teplyakov, A. Molecular replacement with MOLREP. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **66**, 22-25 (2010).
- 160 McCoy, A. J. *et al.* Phaser crystallographic software. *Journal of applied crystallography* **40**, 658-
674 (2007).
- 161 Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G. & Cowtan, K. Features and development of Coot.
Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography **66**, 486-501 (2010).
- 162 Murshudov, G. N., Vagin, A. A. & Dodson, E. J. Refinement of macromolecular structures
by the maximum-likelihood method. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **53**, 240-255 (1997).
- 163 Levinthal, C. Molecular model-building by computer. *Scientific American* **214**, 42-52
(1966).
- 164 Jones, T. A. Diffraction methods for biological macromolecules. Interactive computer
graphics: FRODO. *Methods in enzymology* **115**, 157-171 (1985).
- 165 DeLano Warren L., The PyMol Molecular Graphics System, Version 1.6 (Schrodinger, LLC,
2002).
- 166 Brunger, A. T. & Wells, J. A. Warren L. DeLano 21 June 1972-3 November 2009. *Nature structural & molecular biology* **16**, 1202-1203 (2009).
- 167 Britton, N. F. *Essential mathematical biology*. (Springer, 2003).

-
- 168 Dolinsky, T. J., Nielsen, J. E., McCammon, J. A. & Baker, N. A. PDB2PQR: an automated pipeline for the setup of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations. *Nucleic acids research* **32**, W665-667 (2004).
- 169 Olsson, M. H., Sondergaard, C. R., Rostkowski, M. & Jensen, J. H. PROPKA3: Consistent Treatment of Internal and Surface Residues in Empirical pKa Predictions. *Journal of chemical theory and computation* **7**, 525-537 (2011).
- 170 Unni, S. *et al.* Web servers and services for electrostatics calculations with APBS and PDB2PQR. *Journal of computational chemistry* **32**, 1488-1491 (2011).
- 171 Pavelka, A. *et al.* CAVER: Algorithms for Analyzing Dynamics of Tunnels in Macromolecules. *IEEE/ACM transactions on computational biology and bioinformatics* **13**, 505-517 (2016).
- 172 Biegert, A. & Soding, J. Sequence context-specific profiles for homology searching. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 3770-3775 (2009).
- 173 Ashkenazy, H., Erez, E., Martz, E., Pupko, T. & Ben-Tal, N. ConSurf 2010: calculating evolutionary conservation in sequence and structure of proteins and nucleic acids. *Nucleic acids research* **38**, W529-533 (2010).
- 174 Kall, L., Krogh, A. & Sonnhammer, E. L. L. Advantages of combined transmembrane topology and signal peptide prediction - the Phobius web server. *Nucleic acids research* **35**, W429-W432 (2007).
- 175 Gutmanas, A. *et al.* PDBe: Protein Data Bank in Europe. *Nucleic acids research* **42**, D285-291 (2014).
- 176 Olsen, S. K. *et al.* Crystal Structure of the interleukin-15.interleukin-15 receptor alpha complex: insights into trans and cis presentation. *The Journal of biological chemistry* **282**, 37191-37204 (2007).
- 177 Camougrand, N., Kissova, I., Velours, G. & Manon, S. Uth1p: a yeast mitochondrial protein at the crossroads of stress, degradation and cell death. *FEMS yeast research* **5**, 133-140 (2004).
- 178 Zhang, Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC bioinformatics* **9**, 40 (2008).
- 179 Labourel, A. *et al.* Structural and biochemical characterization of the laminarinase ZgLamCGH16 from *Zobellia galactanivorans* suggests preferred recognition of branched laminarin. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **71**, 173-184 (2015).
- 180 Veelders, M. *et al.* Structural basis of flocculin-mediated social behavior in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 22511-22516 (2010).
- 181 Luis, A. S. *et al.* Understanding How Noncatalytic Carbohydrate Binding Modules Can Display Specificity for Xyloglucan. *Journal of Biological Chemistry* **288**, 4799-4809 (2013).
- 182 Kulicke, W. M., Lettau, A. I. & Thielking, H. Correlation between immunological activity, molar mass, and molecular structure of different (1->3)-beta-D-glucans. *Carbohydrate research* **297**, 135-143 (1997).
- 183 Saito, H., Yoshioka, Y., Yokoi, M. & Yamada, J. Distinct Gelation Mechanism between Linear and Branched (1->3)-Beta-D-Glucans as Revealed by High-Resolution Solid-State C-13 Nmr. *Biopolymers* **29**, 1689-1698 (1990).
- 184 Morris, G. M. *et al.* AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem* **30**, 2785-2791 (2009).
- 185 Kirschner, K. N., Lins, R. D., Maass, A. & Soares, T. A. A Glycam-Based Force Field for Simulations of Lipopolysaccharide Membranes: Parametrization and Validation. *Journal of chemical theory and computation* **8**, 4719-4731 (2012).

-
- 186 Mitchell, A. *et al.* The InterPro protein families database: the classification resource after 15
years. *Nucleic acids research* **43**, D213-221 (2015).
- 187 Zhang, Z. N. *et al.* Systematic analyses reveal uniqueness and origin of the CFEM domain in
fungi. *Sci Rep-Uk* **5** (2015).
- 188 Finn, R. D. *et al.* Pfam: the protein families database. *Nucleic acids research* **42**, D222-230
(2014).
- 189 Britton, N. F. *Essential mathematical biology*. 2nd print edn, (Springer).
- 190 Owens, C. P., Du, J., Dawson, J. H. & Goulding, C. W. Characterization of heme ligation
properties of Rv0203, a secreted heme binding protein involved in Mycobacterium
tuberculosis heme uptake. *Biochemistry* **51**, 1518-1531 (2012).
- 191 Pelissier, P., Camougrand, N., Velours, G. & Guerin, M. Nca3, a Nuclear Gene Involved in
the Mitochondrial Expression of Subunit-6 and Subunit-8 of the Fo-F1 Atp Synthase of
Saccharomyces-Cerevisiae. *Curr Genet* **27**, 409-416 (1995).
- 192 Petersen, T. N., Brunak, S., von Heijne, G. & Nielsen, H. SignalP 4.0: discriminating signal
peptides from transmembrane regions. *Nature methods* **8**, 785-786 (2011).
- 193 Emanuelsson, O., Brunak, S., von Heijne, G. & Nielsen, H. Locating proteins in the cell
using TargetP, SignalP and related tools. *Nature protocols* **2**, 953-971 (2007).
- 194 Svitel, J., Balbo, A., Mariuzza, R. A., Gonzales, N. R. & Schuck, P. Combined affinity and
rate constant distributions of ligand populations from experimental surface binding kinetics
and equilibria. *Biophysical journal* **84**, 4062-4077 (2003).
- 195 Boraston, A. B., Bolam, D. N., Gilbert, H. J. & Davies, G. J. Carbohydrate-binding
modules: fine-tuning polysaccharide recognition. *The Biochemical journal* **382**, 769-781
(2004).
- 196 Dong, W. *et al.* Crystal structural basis for Rv0315, an immunostimulatory antigen and
inactive beta-1,3-glucanase of Mycobacterium tuberculosis. *Sci Rep* **5**, 15073 (2015).
- 197 Byun, E. H. *et al.* Rv0315, a novel immunostimulatory antigen of Mycobacterium
tuberculosis, activates dendritic cells and drives Th1 immune responses. *Journal of molecular
medicine* **90**, 285-298 (2012).
- 198 Trabjerg, E. *et al.* Conformational analysis of large and highly disulfide-stabilized proteins by
integrating online electrochemical reduction into an optimized H/D exchange mass
spectrometry workflow. *Analytical chemistry* **87**, 8880-8888 (2015).
- 199 Nishimasu, H., Fushinobu, S., Shoun, H. & Wakagi, T. Crystal structures of an ATP-
dependent hexokinase with broad substrate specificity from the hyperthermophilic archaeon
Sulfolobus tokodaii. *The Journal of biological chemistry* **282**, 9923-9931 (2007).
- 200 Liberato, M. V. *et al.* Molecular characterization of a family 5 glycoside hydrolase suggests an
induced-fit enzymatic mechanism. *Sci Rep-Uk* **6** (2016).
- 201 Yang, N. *et al.* The contribution of Pir protein family to yeast cell surface display. *Appl
Microbiol Biot* **98**, 2897-2905 (2014).
- 202 Klis, F. M., Brul, S. & De Groot, P. W. Covalently linked wall proteins in ascomycetous
fungi. *Yeast* **27**, 489-493 (2010).
- 203 Ecker, M., Deutzmann, R., Lehle, L., Mersa, V. & Tanner, W. Pir proteins of Saccharomyces
cerevisiae are attached to beta-1,3-glucan by a new protein-carbohydrate linkage. *Journal of
Biological Chemistry* **281**, 11523-11529 (2006).
- 204 Numata, M. & Shinkai, S. 'Supramolecular wrapping chemistry' by helix-forming
polysaccharides: a powerful strategy for generating diverse polymeric nano-architectures.
Chem Commun **47**, 1961-1975 (2011).
- 205 Li, J. *et al.* Purification and Characterization of a New Endo-beta-1,3-glucanase Exhibiting a
High Specificity for Curdlan for Production of beta-1,3-Glucan Oligosaccharides. *Food Sci
Biotechnol* **23**, 799-806 (2014).

-
- 206 Kurakake, M., Yamanouchi, Y., Kinohara, K. & Moriyama, S. Enzymatic Properties of beta-
1,3-Glucanase from *Streptomyces* sp Mo. *J Food Sci* **78**, C502-C506 (2013).
- 207 Hong, T. Y., Cheng, C. W., Huang, J. W. & Meng, M. S. Isolation and biochemical
characterization of an endo-1,3-beta-glucanase from *Streptomyces sioyaensis* containing a C-
terminal family 6 carbohydrate-binding module that binds to 1,3-beta-glucan. *Microbiol-Sgm*
148, 1151-1159 (2002).
- 208 Grunewald, T. A. *et al.* Photon Energy Becomes the Third Dimension in Crystallographic
Texture Analysis. *Angew Chem Int Edit* **55**, 12190-12194 (2016).
- 209 Meidinger, N. *et al.* pnCCD for photon detection from near-infrared to X-rays. *Nucl Instrum*
Meth A **565**, 251-257 (2006).
- 210 Moller, C., Allen, M., V, E., Engel, A. & Muller, D. J. Tapping-mode atomic force
microscopy produces faithful high-resolution images of protein surfaces. *Biophysical journal*
77, 1150-1158 (1999).
- 211 Ene, I. V. *et al.* Cell Wall Remodeling Enzymes Modulate Fungal Cell Wall Elasticity and
Osmotic Stress Resistance. *Mbio* **6** (2015).
- 212 Garcera, A. *et al.* Anchorage of *Candida albicans* Ssr1 to the cell wall, and transcript profiling
of the null mutant. *Res Microbiol* **156**, 911-920 (2005).
- 213 Gao, B. L., Boeglin, W. E. & Brash, A. R. Role of the conserved distal heme asparagine in
coral allene oxide synthase and human catalase. *Faseb J* **22** (2008).
- 214 Karnaukhova, E. *et al.* Characterization of heme binding to recombinant alpha(1)-
microglobulin. *Front Physiol* **5** (2014).
- 215 Kumar, S. & Bandyopadhyay, U. Free heme toxicity and its detoxification systems in
human. *Toxicol Lett* **157**, 175-188 (2005).
- 216 Nakatani, K., Ishikawa, H., Aono, S. & Mizutani, Y. Identification of essential histidine
residues involved in heme binding and Hemozoin formation in heme detoxification protein
from *Plasmodium falciparum*. *Sci Rep* **4**, 6137 (2014).
- 217 Babu, M. *et al.* Interaction landscape of membrane-protein complexes in *Saccharomyces*
cerevisiae. *Nature* **489**, 585-+ (2012).
- 218 Chan, A. C. K. *et al.* Cofacial heme binding is linked to dimerization by a bacterial heme
transport protein. *Journal of molecular biology* **362**, 1108-1119 (2006).
- 219 Owens, C. P. *et al.* The Mycobacterium tuberculosis Secreted Protein Rv0203 Transfers
Heme to Membrane Proteins MmpL3 and MmpL11. *Journal of Biological Chemistry* **288**,
21714-21728 (2013).
- 220 Bailo, R., Bhatt, A. & Ainsa, J. A. Lipid transport in Mycobacterium tuberculosis and its
implications in virulence and drug development. *Biochem Pharmacol* **96**, 159-167 (2015).
- 221 Hargrove, M. S., Whitaker, T., Olson, J. S., Vali, R. J. & Mathews, A. J. Quaternary
structure regulates heme dissociation from human hemoglobin. *Journal of Biological*
Chemistry **272**, 17385-17389 (1997).
- 222 Liu, M. Y. *et al.* Direct heme transfer from IsdA to IsdC in the iron-regulated surface
determinant (Isd) heme acquisition system of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biological*
Chemistry **283**, 6668-6676 (2008).
- 223 Bhakta, M. N. & Wilks, A. The mechanism of heme transfer from the cytoplasmic heme
binding protein PhuS to the delta-regioselective heme oxygenase of *Pseudomonas aeruginosa*.
Biochemistry **45**, 11642-11649 (2006).
- 224 Nygaard, T. K. *et al.* The mechanism of direct heme transfer from the streptococcal cell
surface protein shp to HtsA of the HtsABC transporter. *Journal of Biological Chemistry* **281**,
20761-20771 (2006).

7 Anhang

7.1 Glycan array screening von *ScSun4C*, *PpCcw14A* und *ScCcw14A*

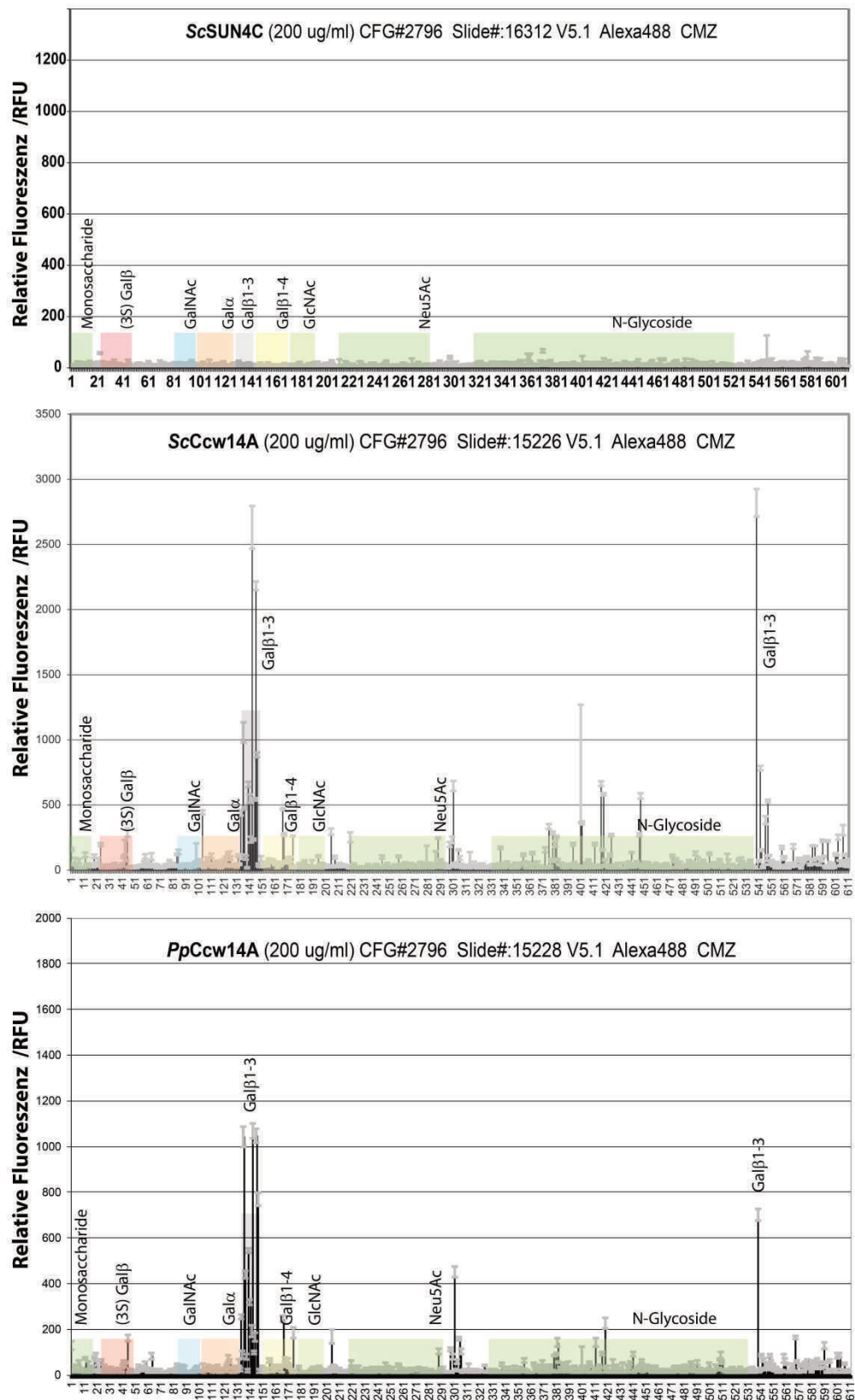


Abbildung 72: Glycan array screening von *ScSun4C*, *PpCcw14A* und *ScCcw14A* durch das Consortium for Functional Glycomics (CFG, Atlanta).

7.2 HD/X MS-Untersuchung von *ScSun4C*

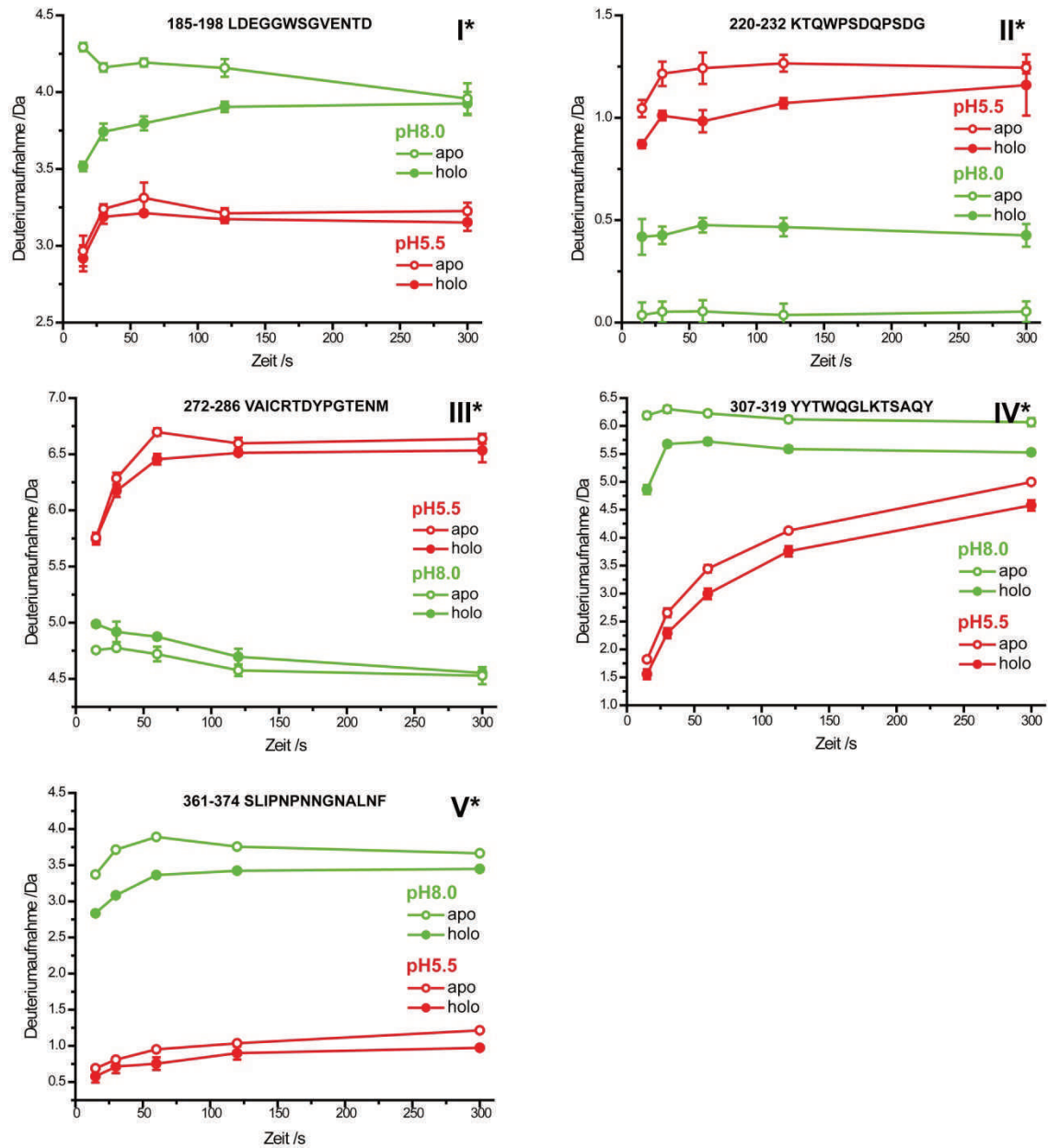


Abbildung 73: A) Die relative Deuteriumaufnahme der Amid-Protonen für HDX-MS Peptide I*, II*, II*, IV* und V* von *ScSun4C* bei 15 s, 30 s, 60 s, 120 und 300 s Inkubation im Deuterierungspuffer.

Apo-ScSun4C pH5.5

Tabelle 7.1 :Die Peptidliste zeigt alle zugewiesenen Peptide für ScSun4C mit Angabe der Sequenz, maximale theoretische Aufnahme (MaxD), berechneter Masse (MHP), gemessenes Peptidcentroid (Center), Standardabweichung des gemessenen Centroids (Center/SD), relative Deuteriumaufnahme (Uptake) mit Standardabweichung (Uptake/SD)

Start	Ende	Sequenz	MaxUptake	MHP	Exposure	Center	Center SD	Uptake	Uptake SD	RT	RT SD
12	17	SGLVPR	4	628.378	0	628.702	0.030	0	0	4.260	0.006
12	17	SGLVPR	4	628.378	0.25	630.129	0.106	1.426387	0.110019	4.265	0.007
12	17	SGLVPR	4	628.378	0.5	630.326	0.098	1.62386	0.102219	4.275	0.003
12	17	SGLVPR	4	628.378	1	630.482	0.089	1.780075	0.094107	4.271	0.004
12	17	SGLVPR	4	628.378	2	630.600	0.086	1.897963	0.090887	4.273	0.005
12	17	SGLVPR	4	628.378	5	630.748	0.101	2.045572	0.105479	4.268	0.006
12	28	SGLVPRGSHNGSIYDGL	15	1728.87	0	1729.788	0.038	0	0	6.011	0.010
12	28	SGLVPRGSHNGSIYDGL	15	1728.87	0.25	1733.860	0.075	4.071684	0.084039	6.021	0.006
12	28	SGLVPRGSHNGSIYDGL	15	1728.87	0.5	1734.317	0.081	4.529513	0.089153	6.034	0.004
12	28	SGLVPRGSHNGSIYDGL	15	1728.87	1	1734.633	0.090	4.844995	0.097469	6.029	0.006
12	28	SGLVPRGSHNGSIYDGL	15	1728.87	2	1734.668	0.110	4.880413	0.116339	6.028	0.013
12	28	SGLVPRGSHNGSIYDGL	15	1728.87	5	1734.688	0.062	4.900316	0.073185	6.028	0.008
18	28	GSHNGSIYDGL	10	1119.51	0	1120.184	0.059	0	0	6.141	0.006
18	28	GSHNGSIYDGL	10	1119.51	0.25	1122.358	0.018	2.17441	0.061965	6.143	0.004
18	28	GSHNGSIYDGL	10	1119.51	0.5	1122.611	0.026	2.427614	0.064819	6.153	0.002
18	28	GSHNGSIYDGL	10	1119.51	1	1122.792	0.010	2.608461	0.060161	6.151	0.004
18	28	GSHNGSIYDGL	10	1119.51	2	1122.744	0.011	2.560435	0.060362	6.150	0.008
18	28	GSHNGSIYDGL	10	1119.51	5	1122.789	0.014	2.60525	0.061083	6.148	0.005
27	31	DLADF	4	580.261	0	580.562	0.004	0	0	6.552	0.009
27	31	DLADF	4	580.261	0.25	580.619	0.016	0.05762	0.016401	6.559	0.003
27	31	DLADF	4	580.261	0.5	580.615	0.010	0.053319	0.010755	6.566	0.002
27	31	DLADF	4	580.261	1	580.616	0.013	0.054148	0.013675	6.565	0.004
27	31	DLADF	4	580.261	2	580.613	0.016	0.051076	0.016027	6.563	0.008
27	31	DLADF	4	580.261	5	580.631	0.006	0.069399	0.007102	6.561	0.005
29	36	ADFSGPYE	6	885.363	0	885.795	0.031	0	0	5.995	0.005
29	36	ADFSGPYE	6	885.363	0.25	886.639	0.024	0.844254	0.039037	5.997	0.005
29	36	ADFSGPYE	6	885.363	0.5	886.787	0.010	0.991893	0.032321	6.015	0.003
29	36	ADFSGPYE	6	885.363	1	886.801	0.037	1.006658	0.047798	6.011	0.006
29	36	ADFSGPYE	6	885.363	2	886.815	0.028	1.020358	0.041608	6.011	0.008
29	36	ADFSGPYE	6	885.363	5	886.858	0.010	1.063103	0.032292	6.007	0.004
29	38	ADFSGPYEKF	8	1160.53	0	1161.164	0.029	0	0	6.476	0.007
29	38	ADFSGPYEKF	8	1160.53	0.25	1161.945	0.045	0.780587	0.053277	6.482	0.004
29	38	ADFSGPYEKF	8	1160.53	0.5	1162.158	0.021	0.993919	0.035691	6.491	0.002
29	38	ADFSGPYEKF	8	1160.53	1	1162.423	0.065	1.258822	0.071087	6.490	0.004
29	38	ADFSGPYEKF	8	1160.53	2	1162.429	0.037	1.264702	0.047064	6.488	0.008
29	38	ADFSGPYEKF	8	1160.53	5	1162.562	0.048	1.397921	0.055799	6.484	0.005
31	38	FSGPYEKF	6	974.462	0	975.016	0.000	0	0	6.164	0.000
31	38	FSGPYEKF	6	974.462	0.25	975.342	0.180	0.325511	0.180448	6.166	0.007
31	38	FSGPYEKF	6	974.462	0.5	975.515	0.141	0.498877	0.141379	6.178	0.007
31	38	FSGPYEKF	6	974.462	1	975.654	0.026	0.637781	0.025633	6.179	0.004
31	38	FSGPYEKF	6	974.462	2	975.650	0.029	0.633634	0.029046	6.169	0.011
31	38	FSGPYEKF	6	974.462	5	975.786	0.127	0.769959	0.126527	6.173	0.005
50	55	SGQGV	5	560.304	0	560.644	0.022	0	0	6.282	0.007
50	55	SGQGV	5	560.304	0.25	561.274	0.005	0.629595	0.022238	6.284	0.003
50	55	SGQGV	5	560.304	0.5	561.505	0.017	0.861153	0.027707	6.293	0.002
50	55	SGQGV	5	560.304	1	561.739	0.013	1.094892	0.02537	6.291	0.004
50	55	SGQGV	5	560.304	2	562.021	0.008	1.37643	0.023262	6.289	0.007
50	55	SGQGV	5	560.304	5	562.236	0.010	1.591664	0.02379	6.287	0.005
53	59	GVIPISW	5	771.44	0	771.810	0.040	0	0	8.051	0.006
53	59	GVIPISW	5	771.44	0.25	772.022	0.023	0.212058	0.046395	8.053	0.025
53	59	GVIPISW	5	771.44	0.5	772.145	0.015	0.335097	0.042785	8.060	0.038
53	59	GVIPISW	5	771.44	1	772.157	0.038	0.346788	0.055349	8.058	0.002
53	59	GVIPISW	5	771.44	2	772.239	0.021	0.428944	0.045236	8.057	0.005
53	59	GVIPISW	5	771.44	5	772.290	0.003	0.479404	0.040305	8.055	0.002
60	65	LDEGGW	5	676.294	0	676.552	0.031	0	0	6.662	0.005
60	65	LDEGGW	5	676.294	0.25	677.585	0.027	1.033447	0.040891	6.668	0.003
60	65	LDEGGW	5	676.294	0.5	677.696	0.011	1.143914	0.032788	6.682	0.005
60	65	LDEGGW	5	676.294	1	677.709	0.003	1.15712	0.030969	6.679	0.007
60	65	LDEGGW	5	676.294	2	677.662	0.019	1.109795	0.036393	6.681	0.011
60	65	LDEGGW	5	676.294	5	677.720	0.020	1.167836	0.03671	6.673	0.004
60	67	LDEGGWSG	7	820.347	0	820.735	0.019	0	0	5.933	0.005
60	67	LDEGGWSG	7	820.347	0.25	822.254	0.009	1.519153	0.021402	5.935	0.004
60	67	LDEGGWSG	7	820.347	0.5	822.387	0.010	1.651921	0.021881	5.947	0.002
60	67	LDEGGWSG	7	820.347	1	822.369	0.035	1.633327	0.040406	5.944	0.003
60	67	LDEGGWSG	7	820.347	2	822.316	0.016	1.581065	0.024992	5.944	0.006
60	67	LDEGGWSG	7	820.347	5	822.336	0.005	1.600457	0.020055	5.943	0.005
60	69	LDEGGWSGVE	9	1048.46	0	1048.956	0.029	0	0	6.480	0.005
60	69	LDEGGWSGVE	9	1048.46	0.25	1050.874	0.041	1.917621	0.050089	6.484	0.004
60	69	LDEGGWSGVE	9	1048.46	0.5	1051.054	0.040	2.097593	0.049562	6.495	0.003
60	69	LDEGGWSGVE	9	1048.46	1	1051.119	0.028	2.1629	0.040127	6.494	0.003
60	69	LDEGGWSGVE	9	1048.46	2	1051.114	0.017	2.157137	0.033447	6.494	0.006
60	69	LDEGGWSGVE	9	1048.46	5	1051.250	0.002	2.293324	0.02902	6.491	0.003
60	71	LDEGGWSGVENT	11	1263.55	0	1264.211	0.037	0	0	6.246	0.004
60	71	LDEGGWSGVENT	11	1263.55	0.25	1266.800	0.166	2.589572	0.169504	6.248	0.003
60	71	LDEGGWSGVENT	11	1263.55	0.5	1267.112	0.173	2.901309	0.176345	6.256	0.002
60	71	LDEGGWSGVENT	11	1263.55	1	1267.148	0.190	2.937161	0.193849	6.255	0.003
60	71	LDEGGWSGVENT	11	1263.55	2	1267.153	0.170	2.942635	0.173653	6.253	0.007
60	71	LDEGGWSGVENT	11	1263.55	5	1267.271	0.187	3.059765	0.19019	6.252	0.003
60	72	LDEGGWSGVENTD	12	1378.58	0	1379.215	0.064	0	0	6.226	0.004
60	72	LDEGGWSGVENTD	12	1378.58	0.25	1382.180	0.076	2.965661	0.099552	6.228	0.003
60	72	LDEGGWSGVENTD	12	1378.58	0.5	1382.454	0.093	3.239805	0.12717	6.237	0.003
60	72	LDEGGWSGVENTD	12	1378.58	1	1382.526	0.169	3.31145	0.080438	6.235	0.004
60	72	LDEGGWSGVENTD	12	1378.58	2	1382.427	0.127	3.211922	0.041835	6.235	0.008
60	72	LDEGGWSGVENTD	12	1378.58	5	1382.540	0.141	3.325335	0.05463	6.232	0.003
60	79	LDEGGWSGVENTDTSTGGSC	19	1971.79	0	1972.797	0.013	0	0	6.253	0.003
60	79	LDEGGWSGVENTDTSTGGSC	19	1971.79	0.25	1977.196	0.090	4.399477	0.091368	6.251	0.003
60	79	LDEGGWSGVENTDTSTGGSC	19	1971.79	0.5	1977.545	0.051	4.748171	0.053064	6.265	0.003

Start	Ende	Sequenz	MaxUptake	MHP	Exposure	Center	Center SD	Uptake	Uptake SD	RT	RT SD
60	79	LDEGGWSGVENTDTSTGGSC	19	1971.79	1	1977.876	0.066	5.078721	0.067151	6.265	0.004
60	79	LDEGGWSGVENTDTSTGGSC	19	1971.79	2	1977.892	0.063	5.095305	0.064221	6.263	0.007
60	79	LDEGGWSGVENTDTSTGGSC	19	1971.79	5	1978.089	0.075	5.292518	0.076341	6.260	0.003
61	67	DEGGWSG	6	707.263	0	707.537	0.047	0	0	5.445	0.003
61	67	DEGGWSG	6	707.263	0.25	708.899	0.015	1.3622	0.04938	5.451	0.005
61	67	DEGGWSG	6	707.263	0.5	708.988	0.022	1.450437	0.052153	5.463	0.002
61	67	DEGGWSG	6	707.263	1	708.961	0.006	1.423749	0.047529	5.460	0.001
61	67	DEGGWSG	6	707.263	2	708.883	0.027	1.345478	0.054435	5.461	0.006
61	67	DEGGWSG	6	707.263	5	708.908	0.019	1.370961	0.050716	5.459	0.004
61	69	DEGGWSGVE	8	935.374	0	935.804	0.024	0	0	6.195	0.009
61	69	DEGGWSGVE	8	935.374	0.25	937.553	0.020	1.748333	0.031311	6.202	0.003
61	69	DEGGWSGVE	8	935.374	0.5	937.722	0.022	1.91769	0.032961	6.209	0.002
61	69	DEGGWSGVE	8	935.374	1	937.805	0.014	2.000705	0.028097	6.207	0.005
61	69	DEGGWSGVE	8	935.374	2	937.795	0.016	1.990471	0.028892	6.206	0.010
61	69	DEGGWSGVE	8	935.374	5	937.876	0.013	2.071518	0.027611	6.205	0.005
61	71	DEGGWSGVENT	10	1150.46	0	1151.039	0.051	0	0	5.965	0.005
61	71	DEGGWSGVENT	10	1150.46	0.25	1153.662	0.220	2.622895	0.225582	5.963	0.003
61	71	DEGGWSGVENT	10	1150.46	0.5	1153.900	0.227	2.860601	0.232555	5.971	0.002
61	71	DEGGWSGVENT	10	1150.46	1	1154.006	0.217	2.966234	0.222656	5.969	0.003
61	71	DEGGWSGVENT	10	1150.46	2	1153.926	0.210	2.886295	0.216406	5.968	0.007
61	71	DEGGWSGVENT	10	1150.46	5	1154.050	0.231	3.011119	0.23697	5.967	0.005
70	84	NTDSTGGSCKEGSY	14	1506.6	0	1507.413	0.055	0	0	4.081	0.004
70	84	NTDSTGGSCKEGSY	14	1506.6	0.25	1511.357	0.047	3.944053	0.072283	4.085	0.005
70	84	NTDSTGGSCKEGSY	14	1506.6	0.5	1511.583	0.006	4.170718	0.055582	4.096	0.002
70	84	NTDSTGGSCKEGSY	14	1506.6	1	1511.679	0.061	4.266246	0.082146	4.093	0.003
70	84	NTDSTGGSCKEGSY	14	1506.6	2	1511.690	0.043	4.27755	0.069848	4.092	0.005
70	84	NTDSTGGSCKEGSY	14	1506.6	5	1511.751	0.049	4.338369	0.073742	4.088	0.003
72	84	DTSTGGSCKEGSY	12	1291.51	0	1292.399	0.066	0	0	4.099	0.005
72	84	DTSTGGSCKEGSY	12	1291.51	0.25	1295.430	0.019	3.03104	0.068521	4.105	0.006
72	84	DTSTGGSCKEGSY	12	1291.51	0.5	1295.630	0.018	3.231176	0.068213	4.115	0.001
72	84	DTSTGGSCKEGSY	12	1291.51	1	1295.703	0.036	3.304556	0.07487	4.111	0.002
72	84	DTSTGGSCKEGSY	12	1291.51	2	1295.731	0.029	3.332647	0.072127	4.113	0.005
72	84	DTSTGGSCKEGSY	12	1291.51	5	1295.804	0.019	3.405753	0.068621	4.109	0.004
94	106	SKTQWPSDQPSDG	10	1432.63	0	1433.343	0.032	0	0	4.785	0.006
94	106	SKTQWPSDQPSDG	10	1432.63	0.25	1434.652	0.048	1.308669	0.057705	4.787	0.006
94	106	SKTQWPSDQPSDG	10	1432.63	0.5	1434.836	0.015	1.492888	0.035515	4.796	0.003
94	106	SKTQWPSDQPSDG	10	1432.63	1	1434.880	0.065	1.536922	0.072963	4.797	0.002
94	106	SKTQWPSDQPSDG	10	1432.63	2	1434.954	0.089	1.610866	0.094582	4.797	0.008
94	106	SKTQWPSDQPSDG	10	1432.63	5	1434.886	0.016	1.543028	0.036147	4.794	0.004
94	112	SKTQWPSDQPSDGRSIGGL	16	2015.98	0	2017.013	0.062	0	0	5.761	0.006
94	112	SKTQWPSDQPSDGRSIGGL	16	2015.98	0.25	2018.288	0.079	1.275309	0.100773	5.763	0.005
94	112	SKTQWPSDQPSDGRSIGGL	16	2015.98	0.5	2018.530	0.046	1.517618	0.077292	5.775	0.003
94	112	SKTQWPSDQPSDGRSIGGL	16	2015.98	1	2018.587	0.080	1.574106	0.101821	5.772	0.005
94	112	SKTQWPSDQPSDGRSIGGL	16	2015.98	2	2018.663	0.081	1.650762	0.102085	5.770	0.007
94	112	SKTQWPSDQPSDGRSIGGL	16	2015.98	5	2018.758	0.037	1.74514	0.072365	5.770	0.003
95	106	KTQWPSDQPSDG	9	1345.6	0	1346.308	0.015	0	0	4.789	0.007
95	106	KTQWPSDQPSDG	9	1345.6	0.25	1347.353	0.039	1.04519	0.041633	4.788	0.004
95	106	KTQWPSDQPSDG	9	1345.6	0.5	1347.523	0.057	1.214716	0.059242	4.798	0.002
95	106	KTQWPSDQPSDG	9	1345.6	1	1347.550	0.075	1.241524	0.076623	4.795	0.002
95	106	KTQWPSDQPSDG	9	1345.6	2	1347.574	0.038	1.265773	0.040734	4.796	0.008
95	106	KTQWPSDQPSDG	9	1345.6	5	1347.552	0.023	1.243785	0.027483	4.793	0.004
95	112	KTQWPSDQPSDGRSIGGL	15	1928.95	0	1930.028	0.057	0	0	5.770	0.009
95	112	KTQWPSDQPSDGRSIGGL	15	1928.95	0.25	1931.098	0.145	1.070479	0.155576	5.773	0.007
95	112	KTQWPSDQPSDGRSIGGL	15	1928.95	0.5	1931.374	0.188	1.346595	0.196159	5.785	0.007
95	112	KTQWPSDQPSDGRSIGGL	15	1928.95	1	1931.458	0.114	1.430314	0.127954	5.781	0.008
95	112	KTQWPSDQPSDGRSIGGL	15	1928.95	2	1931.517	0.065	1.489656	0.086521	5.781	0.011
95	112	KTQWPSDQPSDGRSIGGL	15	1928.95	5	1931.586	0.064	1.558358	0.085455	5.780	0.008
120	128	YRSNTDDY	8	1134.47	0	1135.265	0.105	0	0	4.278	0.006
120	128	YRSNTDDY	8	1134.47	0.25	1135.915	0.035	0.650021	0.110842	4.288	0.006
120	128	YRSNTDDY	8	1134.47	0.5	1136.076	0.026	0.810845	0.108248	4.298	0.002
120	128	YRSNTDDY	8	1134.47	1	1136.214	0.025	0.948445	0.108037	4.297	0.003
120	128	YRSNTDDY	8	1134.47	2	1136.324	0.036	1.05813	0.110898	4.300	0.005
120	128	YRSNTDDY	8	1134.47	5	1136.468	0.047	1.202968	0.115064	4.296	0.004
132	137	WGVDA	5	618.288	0	618.739	0.034	0	0	6.128	0.006
132	137	WGVDA	5	618.288	0.25	619.739	0.008	1.000025	0.035314	6.134	0.004
132	137	WGVDA	5	618.288	0.5	619.929	0.008	1.189593	0.035375	6.142	0.001
132	137	WGVDA	5	618.288	1	620.021	0.006	1.281111	0.034869	6.140	0.004
132	137	WGVDA	5	618.288	2	619.992	0.007	1.252498	0.035074	6.139	0.008
132	137	WGVDA	5	618.288	5	619.979	0.015	1.2391	0.037575	6.137	0.004
138	142	YVVSE	4	596.293	0	596.719	0.045	0	0	4.743	0.005
138	142	YVVSE	4	596.293	0.25	597.083	0.019	0.36353	0.049493	4.749	0.004
138	142	YVVSE	4	596.293	0.5	597.150	0.009	0.431223	0.046364	4.759	0.001
138	142	YVVSE	4	596.293	1	597.122	0.006	0.402558	0.045923	4.755	0.002
138	142	YVVSE	4	596.293	2	597.125	0.032	0.406353	0.055391	4.757	0.006
138	142	YVVSE	4	596.293	5	597.094	0.030	0.375161	0.054347	4.754	0.004
138	143	YVVSEL	5	709.377	0	709.867	0.030	0	0	6.555	0.009
138	143	YVVSEL	5	709.377	0.25	710.561	0.027	0.694462	0.039962	6.559	0.003
138	143	YVVSEL	5	709.377	0.5	710.665	0.010	0.798495	0.031258	6.565	0.002
138	143	YVVSEL	5	709.377	1	710.640	0.040	0.773567	0.049913	6.564	0.004
138	143	YVVSEL	5	709.377	2	710.623	0.039	0.756717	0.049238	6.562	0.008
138	143	YVVSEL	5	709.377	5	710.541	0.015	0.674898	0.033169	6.561	0.003
139	143	VVSEL	4	546.313	0	546.760	0.046	0	0	5.465	0.004
139	143	VVSEL	4	546.313	0.25	547.283	0.009	0.52312	0.046625	5.472	0.005
139	143	VVSEL	4	546.313	0.5	547.326	0.018	0.566489	0.049197	5.484	0.002
139	143	VVSEL	4	546.313	1	547.288	0.022	0.528401	0.050813	5.480	0.002
139	143	VVSEL	4	546.313	2	547.274	0.013	0.514391	0.047633	5.482	0.006
139	143	VVSEL	4	546.313	5	547.211	0.036	0.451034	0.058362	5.479	0.004
139	146	VVSELSND	7	862.415	0	862.875	0.012	0	0	4.708	0.009
139	146	VVSELSND	7	862.415	0.25	863.782	0.022	0.907816	0.025498	4.713	0.003
139	146	VVSELSND	7	862.415	0.5	863.901	0.004	1.026483	0.012828	4.722	0.002
139	146	VVSELSND	7	862.415	1	863.940	0.025	1.065679	0.028039	4.717	0.002
139	146	VVSELSND	7	862.415	2	864.037	0.018	1.162617	0.021533	4.719	0.004
139	146	VVSELSND	7	862.415	5	864.249	0.006	1.374289	0.013765	4.716	0.002
147	159	VAICRTDYPGTEN	11	1438.66	0	1439.487	0.062	0	0	5.018	0.011
147	159	VAICRTDYPGTEN	11	1438.66	0.25	1444.913	0.115	5.426	0.130961	5.031	0.004
147	159	VAICRTDYPGTEN	11	1438.66	0.5	1445.300	0.085	5.813344	0.105671	5.040	0.002
147	159	VAICRTDYPGTEN	11	1438.66	1	1445.456	0.155	5.968987	0.167322	5.036	0.005

Start	Ende	Sequenz	MaxUptake	MHP	Exposure	Center	Center SD	Uptake	Uptake SD	RT	RT SD
147	159	VAICRTDYPGTEN	11	1438.66	2	1445.248	0.146	5.761222	0.158499	5.035	0.010
147	159	VAICRTDYPGTEN	11	1438.66	5	1445.360	0.012	5.872742	0.063312	5.033	0.004
147	160	VAICRTDYPGTENM	12	1569.7	0	1570.644	0.030	0	0	5.727	0.005
147	160	VAICRTDYPGTENM	12	1569.7	0.25	1576.401	0.021	5.756351	0.036644	5.729	0.003
147	160	VAICRTDYPGTENM	12	1569.7	0.5	1576.928	0.042	6.283758	0.051426	5.741	0.004
147	160	VAICRTDYPGTENM	12	1569.7	1	1577.342	0.014	6.697949	0.033137	5.738	0.001
147	160	VAICRTDYPGTENM	12	1569.7	2	1577.240	0.041	6.59573	0.051175	5.738	0.009
147	160	VAICRTDYPGTENM	12	1569.7	5	1577.282	0.032	6.637441	0.043863	5.738	0.006
149	159	ICRTDYPGTEN	9	1268.56	0	1269.358	0.044	0	0	4.403	0.005
149	159	ICRTDYPGTEN	9	1268.56	0.25	1273.442	0.045	4.083369	0.062722	4.406	0.004
149	159	ICRTDYPGTEN	9	1268.56	0.5	1273.593	0.022	4.234649	0.048615	4.417	0.003
149	159	ICRTDYPGTEN	9	1268.56	1	1273.708	0.054	4.349903	0.069719	4.414	0.004
149	159	ICRTDYPGTEN	9	1268.56	2	1273.646	0.009	4.288191	0.044601	4.413	0.006
149	159	ICRTDYPGTEN	9	1268.56	5	1273.621	0.004	4.26253	0.043787	4.411	0.003
151	160	RTDYPGTENM	8	1183.5	0	1184.158	0.065	0	0	5.007	0.010
151	160	RTDYPGTENM	8	1183.5	0.25	1187.421	0.019	3.26238	0.0677	5.014	0.003
151	160	RTDYPGTENM	8	1183.5	0.5	1187.734	0.014	3.575747	0.066347	5.022	0.001
151	160	RTDYPGTENM	8	1183.5	1	1187.940	0.028	3.781988	0.070495	5.020	0.003
151	160	RTDYPGTENM	8	1183.5	2	1187.947	0.028	3.789288	0.070807	5.019	0.008
151	160	RTDYPGTENM	8	1183.5	5	1187.980	0.024	3.822071	0.069303	5.017	0.004
160	165	MVIPTY	4	723.375	0	723.796	0.009	0	0	6.678	0.006
160	165	MVIPTY	4	723.375	0.25	723.871	0.018	0.075428	0.020147	6.691	0.005
160	165	MVIPTY	4	723.375	0.5	723.897	0.006	0.101421	0.010558	6.701	0.001
160	165	MVIPTY	4	723.375	1	723.879	0.007	0.083251	0.010931	6.700	0.003
160	165	MVIPTY	4	723.375	2	723.908	0.020	0.112473	0.022199	6.698	0.010
160	165	MVIPTY	4	723.375	5	723.912	0.025	0.115934	0.026534	6.696	0.006
160	175	MVIPTYVQAGDSLPLT	13	1704.89	0	1706.031	0.042	0	0	7.447	0.006
160	175	MVIPTYVQAGDSLPLT	13	1704.89	0.25	1706.133	0.010	0.101946	0.043252	7.455	0.004
160	175	MVIPTYVQAGDSLPLT	13	1704.89	0.5	1706.177	0.024	0.145921	0.048346	7.466	0.004
160	175	MVIPTYVQAGDSLPLT	13	1704.89	1	1706.148	0.008	0.116103	0.04286	7.463	0.004
160	175	MVIPTYVQAGDSLPLT	13	1704.89	2	1706.237	0.013	0.206012	0.043895	7.462	0.008
160	175	MVIPTYVQAGDSLPLT	13	1704.89	5	1706.258	0.016	0.226253	0.045166	7.460	0.002
160	176	MVIPTYVQAGDSLPLTV	14	1803.96	0	1805.062	0.024	0	0	7.930	0.006
160	176	MVIPTYVQAGDSLPLTV	14	1803.96	0.25	1805.140	0.008	0.078066	0.025495	7.931	0.004
160	176	MVIPTYVQAGDSLPLTV	14	1803.96	0.5	1805.163	0.014	0.100771	0.027996	7.940	0.002
160	176	MVIPTYVQAGDSLPLTV	14	1803.96	1	1805.158	0.014	0.095591	0.028106	7.939	0.002
160	176	MVIPTYVQAGDSLPLTV	14	1803.96	2	1805.194	0.012	0.132243	0.027153	7.939	0.006
160	176	MVIPTYVQAGDSLPLTV	14	1803.96	5	1805.229	0.006	0.16645	0.025125	7.937	0.002
160	179	MVIPTYVQAGDSLPLTVDDQ	17	2146.11	0	2147.368	0.063	0	0	7.737	0.009
160	179	MVIPTYVQAGDSLPLTVDDQ	17	2146.11	0.25	2147.505	0.023	0.137004	0.066755	7.738	0.002
160	179	MVIPTYVQAGDSLPLTVDDQ	17	2146.11	0.5	2147.527	0.025	0.158447	0.067423	7.748	0.001
160	179	MVIPTYVQAGDSLPLTVDDQ	17	2146.11	1	2147.583	0.055	0.214465	0.083282	7.746	0.004
160	179	MVIPTYVQAGDSLPLTVDDQ	17	2146.11	2	2147.668	0.010	0.299786	0.063309	7.747	0.007
160	179	MVIPTYVQAGDSLPLTVDDQ	17	2146.11	5	2147.864	0.026	0.495894	0.067668	7.748	0.002
160	181	MVIPTYVQAGDSLPLTVDDQDT	19	2362.18	0	2363.508	0.042	0	0	7.788	0.010
160	181	MVIPTYVQAGDSLPLTVDDQDT	19	2362.18	0.25	2363.775	0.022	0.267376	0.047802	7.788	0.002
160	181	MVIPTYVQAGDSLPLTVDDQDT	19	2362.18	0.5	2363.861	0.018	0.352992	0.045997	7.797	0.002
160	181	MVIPTYVQAGDSLPLTVDDQDT	19	2362.18	1	2363.982	0.009	0.474203	0.043235	7.794	0.004
160	181	MVIPTYVQAGDSLPLTVDDQDT	19	2362.18	2	2364.170	0.009	0.661749	0.043306	7.794	0.009
160	181	MVIPTYVQAGDSLPLTVDDQDT	19	2362.18	5	2364.569	0.010	1.060792	0.043444	7.796	0.003
160	182	MVIPTYVQAGDSLPLTVDDQDTY	20	2525.25	0	2526.725	0.073	0	0	8.023	0.007
160	182	MVIPTYVQAGDSLPLTVDDQDTY	20	2525.25	0.25	2526.954	0.052	0.228211	0.089634	8.032	0.003
160	182	MVIPTYVQAGDSLPLTVDDQDTY	20	2525.25	0.5	2527.026	0.049	0.300986	0.087703	8.041	0.003
160	182	MVIPTYVQAGDSLPLTVDDQDTY	20	2525.25	1	2527.112	0.131	0.386977	0.149587	8.040	0.001
160	182	MVIPTYVQAGDSLPLTVDDQDTY	20	2525.25	2	2527.317	0.108	0.591753	0.130367	8.038	0.005
160	182	MVIPTYVQAGDSLPLTVDDQDTY	20	2525.25	5	2527.726	0.199	1.000377	0.212026	8.036	0.004
161	175	VIPTYVQAGDSLPLT	12	1573.85	0	1574.734	0.028	0	0	6.956	0.006
161	175	VIPTYVQAGDSLPLT	12	1573.85	0.25	1575.398	0.015	0.664299	0.031908	6.963	0.004
161	175	VIPTYVQAGDSLPLT	12	1573.85	0.5	1575.429	0.072	0.694564	0.077161	6.971	0.004
161	175	VIPTYVQAGDSLPLT	12	1573.85	1	1575.471	0.020	0.736794	0.03445	6.969	0.005
161	175	VIPTYVQAGDSLPLT	12	1573.85	2	1575.399	0.014	0.665354	0.031139	6.969	0.010
161	175	VIPTYVQAGDSLPLT	12	1573.85	5	1575.432	0.035	0.698072	0.044847	6.966	0.003
161	176	VIPTYVQAGDSLPLTV	13	1672.92	0	1673.839	0.021	0	0	7.534	0.004
161	176	VIPTYVQAGDSLPLTV	13	1672.92	0.25	1673.968	0.007	0.128949	0.021827	7.536	0.005
161	176	VIPTYVQAGDSLPLTV	13	1672.92	0.5	1673.976	0.022	0.137121	0.030196	7.551	0.003
161	176	VIPTYVQAGDSLPLTV	13	1672.92	1	1673.965	0.018	0.126303	0.027692	7.548	0.003
161	176	VIPTYVQAGDSLPLTV	13	1672.92	2	1673.986	0.017	0.147229	0.026835	7.547	0.008
161	176	VIPTYVQAGDSLPLTV	13	1672.92	5	1674.011	0.008	0.17217	0.022281	7.546	0.002
166	182	VQAGDSLPLTVDDQDTY	15	1820.89	0	1821.877	0.097	0	0	7.166	0.005
166	182	VQAGDSLPLTVDDQDTY	15	1820.89	0.25	1822.166	0.014	0.28887	0.097922	7.169	0.000
166	182	VQAGDSLPLTVDDQDTY	15	1820.89	0.5	1822.213	0.010	0.336255	0.097424	7.178	0.002
166	182	VQAGDSLPLTVDDQDTY	15	1820.89	1	1822.296	0.001	0.419381	0.096924	7.176	0.001
166	182	VQAGDSLPLTVDDQDTY	15	1820.89	2	1822.606	0.016	0.729179	0.098305	7.174	0.007
166	182	VQAGDSLPLTVDDQDTY	15	1820.89	5	1822.947	0.016	1.07083	0.098169	7.176	0.002
176	182	VDDQDTY	6	839.378	0	839.830	0.027	0	0	4.762	0.006
176	182	VDDQDTY	6	839.378	0.25	840.052	0.008	0.221858	0.028384	4.767	0.004
176	182	VDDQDTY	6	839.378	0.5	840.134	0.009	0.303508	0.028542	4.778	0.001
176	182	VDDQDTY	6	839.378	1	840.213	0.008	0.38295	0.028463	4.774	0.002
176	182	VDDQDTY	6	839.378	2	840.438	0.007	0.608144	0.028032	4.775	0.005
176	182	VDDQDTY	6	839.378	5	840.840	0.005	1.010461	0.027601	4.771	0.003
177	182	VDQDTY	5	740.31	0	740.694	0.018	0	0	4.499	0.005
177	182	VDQDTY	5	740.31	0.25	740.846	0.024	0.151555	0.029524	4.507	0.007
177	182	VDQDTY	5	740.31	0.5	740.893	0.012	0.198887	0.021245	4.518	0.002
177	182	VDQDTY	5	740.31	1	740.947	0.019	0.252904	0.026116	4.515	0.003
177	182	VDQDTY	5	740.31	2	741.100	0.003	0.405893	0.017851	4.518	0.003
177	182	VDQDTY	5	740.31	5	741.360	0.013	0.666213	0.021712	4.512	0.005
182	194	YTWQGLKTSAQY	12	1608.77	0	1609.719	0.017	0	0	6.751	0.007
182	194	YTWQGLKTSAQY	12	1608.77	0.25	1611.539	0.038	1.81945	0.041833	6.753	0.003
182	194	YTWQGLKTSAQY	12	1608.77	0.5	1612.374	0.025	2.65485	0.030424	6.764	0.003
182	194	YTWQGLKTSAQY	12	1608.77	1	1613.163	0.064	3.443959	0.060602	6.762	0.003
182	194	YTWQGLKTSAQY	12	1608.77	2	1613.845	0.019	4.125805	0.025055	6.762	0.009
182	194	YTWQGLKTSAQY	12	1608.77	5	1614.717	0.012	4.997675	0.020474	6.760	0.003
183	188	YTWQGL	5	767.372	0	767.747	0.025	0	0	7.516	0.008
183	188	YTWQGL	5	767.372	0.25	768.829	0.029	1.08253	0.038205	7.526	0.002
183	188	YTWQGL	5	767.372	0.5	769.223	0.009	1.476809	0.02673	7.535	0.003
183	188	YTWQGL	5	767.372	1	769.537	0.021	1.790702	0.032364	7.534	0.005
183	188	YTWQGL	5	767.372	2	769.785	0.010	2.038535	0.026926	7.532	0.008

Start	Ende	Sequenz	MaxUptake	MHP	Exposure	Center	Center SD	Uptake	Uptake SD	RT	RT SD
183	188	YTWQGL	5	767.372	5	770.146	0.035	2.399257	0.043032	7.531	0.003
183	190	YTWQGLKT	7	996.515	0	997.039	0.071	0	0	6.161	0.007
183	190	YTWQGLKT	7	996.515	0.25	998.572	0.021	1.532762	0.073892	6.166	0.003
183	190	YTWQGLKT	7	996.515	0.5	999.191	0.057	2.151605	0.091116	6.175	0.002
183	190	YTWQGLKT	7	996.515	1	999.744	0.042	2.704417	0.082492	6.175	0.003
183	190	YTWQGLKT	7	996.515	2	1000.212	0.073	3.172725	0.101651	6.173	0.008
183	190	YTWQGLKT	7	996.515	5	1000.790	0.032	3.751056	0.077914	6.171	0.004
183	193	YTWQGLK TSAQ	10	1282.64	0	1283.585	0.109	0	0	5.930	0.007
183	193	YTWQGLK TSAQ	10	1282.64	0.25	1285.157	0.018	1.572592	0.110293	5.932	0.004
183	193	YTWQGLK TSAQ	10	1282.64	0.5	1285.853	0.026	2.267864	0.111817	5.939	0.001
183	193	YTWQGLK TSAQ	10	1282.64	1	1286.444	0.036	2.859264	0.114633	5.937	0.005
183	193	YTWQGLK TSAQ	10	1282.64	2	1287.048	0.020	3.463035	0.11057	5.934	0.007
183	193	YTWQGLK TSAQ	10	1282.64	5	1287.854	0.017	4.26911	0.110078	5.935	0.003
183	194	YTWQGLK TSAQY	11	1445.71	0	1446.791	0.153	0	0	6.378	0.007
183	194	YTWQGLK TSAQY	11	1445.71	0.25	1448.345	0.090	1.554616	0.177937	6.384	0.003
183	194	YTWQGLK TSAQY	11	1445.71	0.5	1449.044	0.118	2.253125	0.19336	6.390	0.002
183	194	YTWQGLK TSAQY	11	1445.71	1	1449.704	0.149	2.912809	0.213827	6.389	0.004
183	194	YTWQGLK TSAQY	11	1445.71	2	1450.303	0.145	3.511842	0.211083	6.386	0.009
183	194	YTWQGLK TSAQY	11	1445.71	5	1451.079	0.137	4.287724	0.205469	6.386	0.004
184	193	TWQGLK TSAQ	9	1119.58	0	1120.102	0.036	0	0	5.233	0.004
184	193	TWQGLK TSAQ	9	1119.58	0.25	1121.503	0.036	1.401128	0.051129	5.242	0.004
184	193	TWQGLK TSAQ	9	1119.58	0.5	1122.297	0.045	2.195335	0.057454	5.249	0.003
184	193	TWQGLK TSAQ	9	1119.58	1	1122.927	0.078	2.82504	0.085978	5.246	0.002
184	193	TWQGLK TSAQ	9	1119.58	2	1123.405	0.030	3.302923	0.046551	5.246	0.008
184	193	TWQGLK TSAQ	9	1119.58	5	1124.059	0.042	3.95734	0.055247	5.244	0.004
189	203	K TSAQYYVNNAGISV	14	1614.81	0	1615.734	0.053	0	0	7.165	0.005
189	203	K TSAQYYVNNAGISV	14	1614.81	0.25	1617.466	0.147	1.731713	0.156318	7.164	0.002
189	203	K TSAQYYVNNAGISV	14	1614.81	0.5	1617.750	0.050	2.015826	0.072943	7.178	0.004
189	203	K TSAQYYVNNAGISV	14	1614.81	1	1617.815	0.088	2.081289	0.102586	7.176	0.003
189	203	K TSAQYYVNNAGISV	14	1614.81	2	1617.950	0.048	2.216268	0.071303	7.176	0.008
189	203	K TSAQYYVNNAGISV	14	1614.81	5	1618.134	0.096	2.400142	0.109539	7.176	0.002
194	202	YVNNAGIS	8	1000.47	0	1000.970	0.008	0	0	5.486	0.006
194	202	YVNNAGIS	8	1000.47	0.25	1001.250	0.066	0.279882	0.067002	5.496	0.002
194	202	YVNNAGIS	8	1000.47	0.5	1001.305	0.003	0.335285	0.008848	5.505	0.002
194	202	YVNNAGIS	8	1000.47	1	1001.412	0.004	0.442458	0.009447	5.504	0.003
194	202	YVNNAGIS	8	1000.47	2	1001.638	0.011	0.668152	0.013459	5.503	0.007
194	202	YVNNAGIS	8	1000.47	5	1001.836	0.006	0.865947	0.010298	5.500	0.006
194	204	YVNNAGISVE	10	1228.58	0	1229.240	0.059	0	0	5.994	0.006
194	204	YVNNAGISVE	10	1228.58	0.25	1229.485	0.018	0.24509	0.061456	6.006	0.004
194	204	YVNNAGISVE	10	1228.58	0.5	1229.592	0.013	0.351693	0.060175	6.016	0.005
194	204	YVNNAGISVE	10	1228.58	1	1229.715	0.021	0.4747	0.06229	6.014	0.008
194	204	YVNNAGISVE	10	1228.58	2	1229.907	0.025	0.667243	0.063707	6.014	0.010
194	204	YVNNAGISVE	10	1228.58	5	1230.189	0.027	0.94896	0.064878	6.010	0.006
195	202	YVNNAGIS	7	837.41	0	837.812	0.016	0	0	4.573	0.004
195	202	YVNNAGIS	7	837.41	0.25	838.051	0.014	0.238712	0.021782	4.575	0.006
195	202	YVNNAGIS	7	837.41	0.5	838.166	0.017	0.353456	0.023361	4.584	0.002
195	202	YVNNAGIS	7	837.41	1	838.283	0.020	0.470273	0.025814	4.582	0.003
195	202	YVNNAGIS	7	837.41	2	838.458	0.018	0.645528	0.0242	4.584	0.005
195	202	YVNNAGIS	7	837.41	5	838.677	0.003	0.864914	0.01671	4.580	0.004
195	203	YVNNAGISV	8	936.479	0	936.910	0.037	0	0	5.756	0.007
195	203	YVNNAGISV	8	936.479	0.25	937.148	0.009	0.238641	0.037885	5.767	0.005
195	203	YVNNAGISV	8	936.479	0.5	937.259	0.007	0.348881	0.037535	5.773	0.003
195	203	YVNNAGISV	8	936.479	1	937.391	0.024	0.481427	0.044075	5.772	0.006
195	203	YVNNAGISV	8	936.479	2	937.618	0.023	0.708469	0.04358	5.767	0.009
195	203	YVNNAGISV	8	936.479	5	937.872	0.030	0.962504	0.047575	5.769	0.001
195	204	YVNNAGISVE	9	1065.52	0	1066.053	0.056	0	0	5.353	0.006
195	204	YVNNAGISVE	9	1065.52	0.25	1066.319	0.010	0.266028	0.05689	5.368	0.007
195	204	YVNNAGISVE	9	1065.52	0.5	1066.414	0.016	0.360544	0.05822	5.379	0.003
195	204	YVNNAGISVE	9	1065.52	1	1066.531	0.030	0.477697	0.063729	5.376	0.003
195	204	YVNNAGISVE	9	1065.52	2	1066.734	0.033	0.680755	0.065027	5.372	0.012
195	204	YVNNAGISVE	9	1065.52	5	1066.980	0.036	0.92668	0.066311	5.375	0.003
217	237	GNWAPLNFGAGSSDGVAYLSL	19	2096.01	0	2097.264	0.014	0	0	6.110	0.009
217	237	GNWAPLNFGAGSSDGVAYLSL	19	2096.01	0.25	2099.777	0.019	2.512456	0.024104	6.121	0.004
217	237	GNWAPLNFGAGSSDGVAYLSL	19	2096.01	0.5	2100.151	0.023	2.886351	0.027038	6.129	0.003
217	237	GNWAPLNFGAGSSDGVAYLSL	19	2096.01	1	2100.558	0.026	3.294089	0.029674	6.129	0.005
217	237	GNWAPLNFGAGSSDGVAYLSL	19	2096.01	2	2100.893	0.033	3.628925	0.035873	6.127	0.011
217	237	GNWAPLNFGAGSSDGVAYLSL	19	2096.01	5	2101.472	0.014	4.207697	0.020117	6.122	0.006
220	224	APLNF	3	561.303	0	561.334	0.038	0	0	6.722	0.004
220	224	APLNF	3	561.303	0.25	561.567	0.016	0.233046	0.041262	6.736	0.003
220	224	APLNF	3	561.303	0.5	561.626	0.004	0.291653	0.038288	6.744	0.002
220	224	APLNF	3	561.303	1	561.647	0.003	0.313087	0.038262	6.743	0.003
220	224	APLNF	3	561.303	2	561.661	0.003	0.326872	0.038258	6.744	0.007
220	224	APLNF	3	561.303	5	561.636	0.005	0.30131	0.038487	6.742	0.004
225	234	GAGSSDGVAY	9	883.379	0	883.905	0.042	0	0	5.011	0.009
225	234	GAGSSDGVAY	9	883.379	0.25	884.271	0.038	0.366522	0.056878	5.019	0.006
225	234	GAGSSDGVAY	9	883.379	0.5	884.373	0.037	0.468556	0.055962	5.029	0.003
225	234	GAGSSDGVAY	9	883.379	1	884.493	0.033	0.588511	0.053629	5.027	0.003
225	234	GAGSSDGVAY	9	883.379	2	884.628	0.044	0.722812	0.060765	5.029	0.007
225	234	GAGSSDGVAY	9	883.379	5	884.791	0.036	0.886033	0.055505	5.025	0.005
225	235	GAGSSDGVAYL	10	996.463	0	997.025	0.040	0	0	6.491	0.004
225	235	GAGSSDGVAYL	10	996.463	0.25	997.322	0.080	0.296526	0.089667	6.498	0.003
225	235	GAGSSDGVAYL	10	996.463	0.5	997.424	0.093	0.398519	0.101358	6.511	0.003
225	235	GAGSSDGVAYL	10	996.463	1	997.505	0.099	0.479398	0.10727	6.509	0.003
225	235	GAGSSDGVAYL	10	996.463	2	997.659	0.121	0.633171	0.127823	6.508	0.007
225	235	GAGSSDGVAYL	10	996.463	5	997.785	0.119	0.75946	0.125976	6.505	0.004
235	249	LSLIPNPNNGNALNF	12	1597.83	0	1598.870	0.047	0	0	7.877	0.005
235	249	LSLIPNPNNGNALNF	12	1597.83	0.25	1599.364	0.006	0.494447	0.047146	7.882	0.004
235	249	LSLIPNPNNGNALNF	12	1597.83	0.5	1599.446	0.012	0.576002	0.048342	7.892	0.003
235	249	LSLIPNPNNGNALNF	12	1597.83	1	1599.519	0.044	0.649559	0.064551	7.892	0.002
235	249	LSLIPNPNNGNALNF	12	1597.83	2	1599.634	0.035	0.764627	0.058142	7.891	0.008
235	249	LSLIPNPNNGNALNF	12	1597.83	5	1599.805	0.012	0.9353	0.048423	7.887	0.002
236	249	SLIPNPNNGNALNF	11	1484.75	0	1485.910	0.127	0	0	7.392	0.006
236	249	SLIPNPNNGNALNF	11	1484.75	0.25	1486.601	0.030	0.690703	0.013077	7.401	0.003
236	249	SLIPNPNNGNALNF	11	1484.75	0.5	1486.720	0.042	0.81029	0.013412	7.410	0.004
236	249	SLIPNPNNGNALNF	11	1484.75	1	1486.862	0.030	0.952044	0.013074	7.408	0.005
236	249	SLIPNPNNGNALNF	11	1484.75	2	1486.947	0.029	1.036705	0.013062	7.407	0.008
236	249	SLIPNPNNGNALNF	11	1484.75	5	1487.124	0.021	1.214104	0.012899	7.405	0.002

Start	Ende	Sequenz	MaxUptake	MHP	Exposure	Center	Center SD	Uptake	Uptake SD	RT	RT SD
238	249	IPNPNNGNALNF	9	1284.63	0	1285.269	0.040	0	0	6.724	0.005
238	249	IPNPNNGNALNF	9	1284.63	0.25	1286.041	0.028	0.772157	0.049048	6.730	0.003
238	249	IPNPNNGNALNF	9	1284.63	0.5	1286.148	0.037	0.87916	0.054721	6.739	0.002
238	249	IPNPNNGNALNF	9	1284.63	1	1286.300	0.030	1.031058	0.050362	6.737	0.003
238	249	IPNPNNGNALNF	9	1284.63	2	1286.424	0.033	1.154585	0.052426	6.737	0.008
238	249	IPNPNNGNALNF	9	1284.63	5	1286.666	0.029	1.396761	0.049632	6.736	0.004
239	247	PNPNNGNAL	6	910.438	0	911.438	0.170	0	0	6.600	0.006
239	247	PNPNNGNAL	6	910.438	0.25	911.787	0.094	0.348798	0.194139	6.600	0.003
239	247	PNPNNGNAL	6	910.438	0.5	911.845	0.105	0.406156	0.199682	6.608	0.001
239	247	PNPNNGNAL	6	910.438	1	911.910	0.099	0.472067	0.196799	6.607	0.003
239	247	PNPNNGNAL	6	910.438	2	911.975	0.088	0.536519	0.191645	6.605	0.007
239	247	PNPNNGNAL	6	910.438	5	912.072	0.069	0.634043	0.183616	6.604	0.003
250	255	NVKIVA	5	643.414	0	643.761	0.059	0	0	4.474	0.006
250	255	NVKIVA	5	643.414	0.25	643.858	0.021	0.0978	0.062473	4.483	0.006
250	255	NVKIVA	5	643.414	0.5	643.883	0.022	0.122653	0.062845	4.493	0.003
250	255	NVKIVA	5	643.414	1	643.876	0.033	0.115525	0.06769	4.491	0.002
250	255	NVKIVA	5	643.414	2	643.932	0.030	0.17141	0.066213	4.495	0.005
250	255	NVKIVA	5	643.414	5	643.979	0.028	0.21853	0.065315	4.490	0.004
250	256	NVKIVAA	6	714.451	0	714.826	0.023	0	0	4.386	0.006
250	256	NVKIVAA	6	714.451	0.25	714.943	0.022	0.116803	0.031659	4.395	0.004
250	256	NVKIVAA	6	714.451	0.5	714.978	0.027	0.151266	0.035506	4.406	0.002
250	256	NVKIVAA	6	714.451	1	714.997	0.027	0.170727	0.03573	4.402	0.003
250	256	NVKIVAA	6	714.451	2	715.005	0.017	0.178445	0.028614	4.406	0.006
250	256	NVKIVAA	6	714.451	5	715.100	0.012	0.273216	0.025682	4.401	0.004
250	257	NVKIVAAD	7	829.478	0	829.863	0.038	0	0	4.299	0.007
250	257	NVKIVAAD	7	829.478	0.25	830.105	0.027	0.242747	0.04642	4.306	0.007
250	257	NVKIVAAD	7	829.478	0.5	830.148	0.026	0.285383	0.045787	4.317	0.002
250	257	NVKIVAAD	7	829.478	1	830.174	0.018	0.311719	0.041724	4.314	0.004
250	257	NVKIVAAD	7	829.478	2	830.314	0.032	0.451632	0.049168	4.315	0.006
250	257	NVKIVAAD	7	829.478	5	830.519	0.028	0.656331	0.046888	4.311	0.006
250	258	NVKIVAADD	8	944.505	0	944.971	0.030	0	0	4.349	0.005
250	258	NVKIVAADD	8	944.505	0.25	945.413	0.025	0.44154	0.038836	4.355	0.006
250	258	NVKIVAADD	8	944.505	0.5	945.481	0.063	0.510438	0.069609	4.366	0.003
250	258	NVKIVAADD	8	944.505	1	945.490	0.025	0.518604	0.038915	4.363	0.003
250	258	NVKIVAADD	8	944.505	2	945.619	0.018	0.647552	0.035139	4.363	0.005
250	258	NVKIVAADD	8	944.505	5	945.828	0.036	0.85735	0.047109	4.359	0.005
250	260	NVKIVAADDSS	10	1118.57	0	1119.163	0.079	0	0	4.247	0.007
250	260	NVKIVAADDSS	10	1118.57	0.25	1119.804	0.057	0.640418	0.097875	4.254	0.006
250	260	NVKIVAADDSS	10	1118.57	0.5	1119.790	0.175	0.626507	0.192188	4.264	0.002
250	260	NVKIVAADDSS	10	1118.57	1	1119.887	0.117	0.723509	0.14101	4.262	0.002
250	260	NVKIVAADDSS	10	1118.57	2	1120.276	0.084	1.112647	0.115282	4.264	0.005
250	260	NVKIVAADDSS	10	1118.57	5	1120.648	0.033	1.484129	0.086104	4.260	0.005
250	264	NVKIVAADDSSSTVNG	14	1489.75	0	1490.659	0.056	0	0	4.587	0.006
250	264	NVKIVAADDSSSTVNG	14	1489.75	0.25	1491.729	0.028	1.070647	0.062654	4.588	0.002
250	264	NVKIVAADDSSSTVNG	14	1489.75	0.5	1491.924	0.026	1.265645	0.061623	4.599	0.002
250	264	NVKIVAADDSSSTVNG	14	1489.75	1	1492.179	0.060	1.520612	0.081896	4.595	0.002
250	264	NVKIVAADDSSSTVNG	14	1489.75	2	1492.319	0.099	1.660073	0.113417	4.594	0.010
250	264	NVKIVAADDSSSTVNG	14	1489.75	5	1492.720	0.094	2.060927	0.109314	4.592	0.003
291	295	FVLYN	4	655.345	0	655.707	0.035	0	0	6.626	0.005
291	295	FVLYN	4	655.345	0.25	655.824	0.010	0.116476	0.036749	6.627	0.003
291	295	FVLYN	4	655.345	0.5	655.862	0.018	0.154392	0.039913	6.634	0.003
291	295	FVLYN	4	655.345	1	655.874	0.013	0.167302	0.037792	6.632	0.003
291	295	FVLYN	4	655.345	2	655.909	0.004	0.201663	0.035583	6.631	0.009
291	295	FVLYN	4	655.345	5	655.922	0.019	0.215036	0.040019	6.629	0.003

Holo-ScSun4C pH5.5

Start	End	Sequence	MaxUptake	MHP	Exposure	Center	Center SD	Uptake	Uptake SD	RT	RT SD
12	17	SGLVPR	4	628.378	0	628.675	0.016	0	0	4.266	0.004
12	17	SGLVPR	4	628.378	0.25	629.907	0.034	1.231714	0.037844	4.271	0.001
12	17	SGLVPR	4	628.378	0.5	630.108	0.017	1.432958	0.023472	4.273	0.005
12	17	SGLVPR	4	628.378	1	630.239	0.038	1.56382	0.041359	4.274	0.006
12	17	SGLVPR	4	628.378	2	630.306	0.020	1.631032	0.025473	4.273	0.002
12	17	SGLVPR	4	628.378	5	630.522	0.025	1.847129	0.029688	4.273	0.005
12	28	SGLVPRGSHNGSIYGD	15	1728.866	0	1729.806	0.036	0	0	6.015	0.006
12	28	SGLVPRGSHNGSIYGD	15	1728.866	0.25	1733.846	0.056	4.039094	0.067035	6.025	0.006
12	28	SGLVPRGSHNGSIYGD	15	1728.866	0.5	1734.288	0.017	4.481412	0.040025	6.022	0.008
12	28	SGLVPRGSHNGSIYGD	15	1728.866	1	1734.520	0.038	4.713663	0.052787	6.023	0.006
12	28	SGLVPRGSHNGSIYGD	15	1728.866	2	1734.559	0.046	4.752956	0.058662	6.026	0.007
12	28	SGLVPRGSHNGSIYGD	15	1728.866	5	1734.605	0.058	4.798252	0.067927	6.028	0.010
14	28	LVPRGSHNGSIYGD	13	1584.813	0	1585.726	0.071	0	0	5.741	0.007
14	28	LVPRGSHNGSIYGD	13	1584.813	0.25	1589.237	0.213	3.510662	0.224825	5.743	0.005
14	28	LVPRGSHNGSIYGD	13	1584.813	0.5	1589.392	0.222	3.66623	0.232785	5.743	0.005
14	28	LVPRGSHNGSIYGD	13	1584.813	1	1589.655	0.137	3.928663	0.154451	5.744	0.006
14	28	LVPRGSHNGSIYGD	13	1584.813	2	1589.408	0.140	3.681978	0.157321	5.747	0.006
14	28	LVPRGSHNGSIYGD	13	1584.813	5	1589.430	0.405	3.703945	0.41093	5.750	0.008
18	28	GSHNGSIYGD	10	1119.507	0	1120.294	0.078	0	0	6.148	0.007
18	28	GSHNGSIYGD	10	1119.507	0.25	1122.394	0.026	2.100296	0.081665	6.149	0.004
18	28	GSHNGSIYGD	10	1119.507	0.5	1122.621	0.024	2.32705	0.081014	6.148	0.005
18	28	GSHNGSIYGD	10	1119.507	1	1122.778	0.027	2.483634	0.081989	6.147	0.004
18	28	GSHNGSIYGD	10	1119.507	2	1122.746	0.015	2.452172	0.078991	6.150	0.006
18	28	GSHNGSIYGD	10	1119.507	5	1122.629	0.312	2.334439	0.321634	6.153	0.006
18	30	GSHNGSIYGD	12	1305.571	0	1306.233	0.006	0	0	5.822	0.006
18	30	GSHNGSIYGD	12	1305.571	0.25	1308.669	0.134	2.436006	0.134432	5.819	0.003
18	30	GSHNGSIYGD	12	1305.571	0.5	1308.994	0.123	2.761098	0.123355	5.819	0.004
18	30	GSHNGSIYGD	12	1305.571	1	1309.350	0.106	3.117704	0.105818	5.817	0.002
18	30	GSHNGSIYGD	12	1305.571	2	1309.455	0.026	3.222282	0.027029	5.818	0.006
18	30	GSHNGSIYGD	12	1305.571	5	1309.565	0.082	3.332414	0.082483	5.822	0.005
27	31	DLADF	4	580.261	0	580.549	0.010	0	0	6.557	0.007
27	31	DLADF	4	580.261	0.25	580.615	0.010	0.066793	0.014571	6.559	0.002
27	31	DLADF	4	580.261	0.5	580.642	0.002	0.093888	0.010563	6.560	0.004
27	31	DLADF	4	580.261	1	580.642	0.013	0.093451	0.016429	6.559	0.005

Start	Ende	Sequenz	MaxUptake	MHP	Exposure	Center	Center SD	Uptake	Uptake SD	RT	RT SD
27	31	DLADF	4	580.261	2	580.623	0.011	0.074776	0.015369	6.563	0.005
27	31	DLADF	4	580.261	5	580.626	0.019	0.076939	0.021782	6.566	0.006
29	36	ADFSGPYE	6	885.363	0	885.813	0.007	0	0	5.996	0.007
29	36	ADFSGPYE	6	885.363	0.25	886.560	0.031	0.746284	0.031973	6.003	0.003
29	36	ADFSGPYE	6	885.363	0.5	886.694	0.007	0.880396	0.009765	6.004	0.003
29	36	ADFSGPYE	6	885.363	1	886.698	0.015	0.884397	0.016673	6.002	0.002
29	36	ADFSGPYE	6	885.363	2	886.707	0.014	0.893857	0.015529	6.006	0.006
29	36	ADFSGPYE	6	885.363	5	886.640	0.264	0.826252	0.264121	6.008	0.006
29	38	ADFSGPYEKF	8	1160.526	0	1161.350	0.052	0	0	6.476	0.004
29	38	ADFSGPYEKF	8	1160.526	0.25	1162.070	0.049	0.719527	0.071418	6.485	0.004
29	38	ADFSGPYEKF	8	1160.526	0.5	1162.261	0.021	0.910442	0.055829	6.483	0.004
29	38	ADFSGPYEKF	8	1160.526	1	1162.313	0.072	0.962295	0.088338	6.484	0.005
29	38	ADFSGPYEKF	8	1160.526	2	1162.423	0.038	1.072604	0.064359	6.487	0.006
29	38	ADFSGPYEKF	8	1160.526	5	1162.359	0.335	1.008733	0.339103	6.490	0.006
31	36	FSGPYE	4	699.298	0	699.620	0.005	0	0	5.590	0.006
31	36	FSGPYE	4	699.298	0.25	700.025	0.008	0.405431	0.009376	5.591	0.002
31	36	FSGPYE	4	699.298	0.5	700.123	0.021	0.502988	0.021427	5.593	0.002
31	36	FSGPYE	4	699.298	1	700.102	0.007	0.482248	0.008898	5.591	0.003
31	36	FSGPYE	4	699.298	2	700.201	0.021	0.580853	0.022019	5.591	0.005
31	36	FSGPYE	4	699.298	5	700.298	0.079	0.678395	0.079668	5.599	0.004
31	38	FSGPYEKF	6	974.462	0	974.941	0.017	0	0	6.178	0.006
31	38	FSGPYEKF	6	974.462	0.25	975.244	0.059	0.303418	0.061667	6.182	0.005
31	38	FSGPYEKF	6	974.462	0.5	975.312	0.072	0.371049	0.074188	6.181	0.005
31	38	FSGPYEKF	6	974.462	1	975.333	0.035	0.39217	0.038969	6.181	0.004
31	38	FSGPYEKF	6	974.462	2	975.457	0.049	0.516478	0.051768	6.183	0.006
31	38	FSGPYEKF	6	974.462	5	975.445	0.174	0.504706	0.175177	6.186	0.005
32	38	SGPYEKF	5	827.393	0	827.901	0.050	0	0	5.411	0.006
32	38	SGPYEKF	5	827.393	0.25	828.086	0.045	0.184053	0.067579	5.419	0.002
32	38	SGPYEKF	5	827.393	0.5	828.150	0.043	0.248432	0.066134	5.419	0.004
32	38	SGPYEKF	5	827.393	1	828.143	0.046	0.242013	0.067964	5.420	0.004
32	38	SGPYEKF	5	827.393	2	828.155	0.030	0.253248	0.058391	5.419	0.006
32	38	SGPYEKF	5	827.393	5	828.153	0.097	0.251373	0.108919	5.424	0.005
49	60	PSGQGVIPISWL	9	1253.689	0	1254.530	0.173	0	0	8.650	0.008
49	60	PSGQGVIPISWL	9	1253.689	0.25	1254.559	0.053	0.02901	0.18111	8.657	0.005
49	60	PSGQGVIPISWL	9	1253.689	0.5	1254.666	0.026	0.136635	0.175052	8.656	0.003
49	60	PSGQGVIPISWL	9	1253.689	1	1254.711	0.037	0.181875	0.17713	8.659	0.006
49	60	PSGQGVIPISWL	9	1253.689	2	1254.787	0.022	0.256931	0.174626	8.662	0.006
49	60	PSGQGVIPISWL	9	1253.689	5	1254.771	0.089	0.241489	0.194669	8.668	0.010
50	55	SGQGV	5	560.304	0	560.662	0.017	0	0	6.286	0.006
50	55	SGQGV	5	560.304	0.25	561.194	0.008	0.531825	0.01847	6.286	0.004
50	55	SGQGV	5	560.304	0.5	561.433	0.017	0.770619	0.024162	6.284	0.005
50	55	SGQGV	5	560.304	1	561.673	0.008	1.01078	0.018389	6.284	0.005
50	55	SGQGV	5	560.304	2	561.936	0.012	1.273332	0.020809	6.286	0.006
50	55	SGQGV	5	560.304	5	562.170	0.009	1.508071	0.019058	6.288	0.007
53	59	GVIPISW	5	771.440	0	771.858	0.035	0	0	8.051	0.010
53	59	GVIPISW	5	771.440	0.25	772.020	0.008	0.161429	0.035872	8.052	0.004
53	59	GVIPISW	5	771.440	0.5	772.072	0.040	0.213403	0.053187	8.054	0.003
53	59	GVIPISW	5	771.440	1	772.120	0.041	0.262115	0.053477	8.055	0.004
53	59	GVIPISW	5	771.440	2	772.202	0.020	0.343541	0.040156	8.055	0.005
53	59	GVIPISW	5	771.440	5	772.089	0.011	0.23041	0.036723	8.061	0.005
60	65	LDEGGW	5	676.294	0	676.615	0.015	0	0	6.664	0.007
60	65	LDEGGW	5	676.294	0.25	677.567	0.005	0.952254	0.015341	6.671	0.004
60	65	LDEGGW	5	676.294	0.5	677.640	0.021	1.025648	0.025911	6.669	0.005
60	65	LDEGGW	5	676.294	1	677.638	0.026	1.023122	0.029847	6.670	0.004
60	65	LDEGGW	5	676.294	2	677.635	0.027	1.019986	0.03055	6.674	0.008
60	65	LDEGGW	5	676.294	5	677.677	0.002	1.062019	0.014783	6.678	0.009
60	67	LDEGGWSG	7	820.347	0	820.755	0.004	0	0	5.936	0.006
60	67	LDEGGWSG	7	820.347	0.25	822.231	0.011	1.476044	0.011797	5.939	0.004
60	67	LDEGGWSG	7	820.347	0.5	822.293	0.022	1.537413	0.022096	5.939	0.004
60	67	LDEGGWSG	7	820.347	1	822.302	0.019	1.546299	0.019232	5.939	0.003
60	67	LDEGGWSG	7	820.347	2	822.229	0.021	1.474	0.021249	5.941	0.004
60	67	LDEGGWSG	7	820.347	5	822.280	0.020	1.524274	0.020402	5.943	0.004
60	69	LDEGGWSGVE	9	1048.458	0	1048.965	0.012	0	0	6.482	0.005
60	69	LDEGGWSGVE	9	1048.458	0.25	1050.813	0.018	1.848309	0.0219	6.489	0.004
60	69	LDEGGWSGVE	9	1048.458	0.5	1050.972	0.005	2.007626	0.013535	6.486	0.005
60	69	LDEGGWSGVE	9	1048.458	1	1051.060	0.008	2.095543	0.014784	6.490	0.004
60	69	LDEGGWSGVE	9	1048.458	2	1051.030	0.042	2.064778	0.04422	6.489	0.005
60	69	LDEGGWSGVE	9	1048.458	5	1051.134	0.001	2.168986	0.012498	6.496	0.006
60	71	LDEGGWSGVENT	11	1263.549	0	1264.354	0.095	0	0	6.249	0.005
60	71	LDEGGWSGVENT	11	1263.549	0.25	1266.790	0.142	2.436802	0.170919	6.251	0.004
60	71	LDEGGWSGVENT	11	1263.549	0.5	1266.967	0.157	2.613832	0.183845	6.248	0.004
60	71	LDEGGWSGVENT	11	1263.549	1	1267.112	0.158	2.758553	0.184139	6.250	0.005
60	71	LDEGGWSGVENT	11	1263.549	2	1267.074	0.153	2.720372	0.179955	6.252	0.004
60	71	LDEGGWSGVENT	11	1263.549	5	1267.143	0.196	2.789463	0.217436	6.258	0.007
60	72	LDEGGWSGVENTD	12	1378.576	0	1379.229	0.054	0	0	6.229	0.006
60	72	LDEGGWSGVENTD	12	1378.576	0.25	1382.147	0.065	2.918099	0.084793	6.231	0.005
60	72	LDEGGWSGVENTD	12	1378.576	0.5	1382.417	0.135	3.187595	0.014016	6.229	0.004
60	72	LDEGGWSGVENTD	12	1378.576	1	1382.440	0.101	3.211186	0.011847	6.231	0.005
60	72	LDEGGWSGVENTD	12	1378.576	2	1382.402	0.099	3.172645	0.011809	6.231	0.005
60	72	LDEGGWSGVENTD	12	1378.576	5	1382.280	0.402	3.151416	0.055476	6.237	0.007
60	73	LDEGGWSGVENTDT	13	1479.623	0	1480.311	0.038	0	0	6.227	0.005
60	73	LDEGGWSGVENTDT	13	1479.623	0.25	1483.405	0.036	3.093504	0.052427	6.229	0.003
60	73	LDEGGWSGVENTDT	13	1479.623	0.5	1483.714	0.055	3.40272	0.067057	6.227	0.004
60	73	LDEGGWSGVENTDT	13	1479.623	1	1483.874	0.048	3.562932	0.061409	6.229	0.005
60	73	LDEGGWSGVENTDT	13	1479.623	2	1483.792	0.132	3.481113	0.137395	6.229	0.005
60	73	LDEGGWSGVENTDT	13	1479.623	5	1483.825	0.515	3.514362	0.516391	6.236	0.007
60	79	LDEGGWSGVENTDTSTGGSC	19	1971.787	0	1972.908	0.100	0	0	6.254	0.006
60	79	LDEGGWSGVENTDTSTGGSC	19	1971.787	0.25	1976.854	0.177	3.946058	0.203128	6.259	0.006
60	79	LDEGGWSGVENTDTSTGGSC	19	1971.787	0.5	1977.116	0.175	4.20826	0.201637	6.254	0.006
60	79	LDEGGWSGVENTDTSTGGSC	19	1971.787	1	1977.094	0.128	4.18573	0.162062	6.261	0.004
60	79	LDEGGWSGVENTDTSTGGSC	19	1971.787	2	1977.546	0.072	4.638164	0.123118	6.257	0.007
60	79	LDEGGWSGVENTDTSTGGSC	19	1971.787	5	1977.394	0.707	4.4863	0.714265	6.264	0.005
60	84	LDEGGWSGVENTDTSTGGSCKEGSY	24	2536.042	0	2537.548	0.046	0	0	6.017	0.007
60	84	LDEGGWSGVENTDTSTGGSCKEGSY	24	2536.042	0.25	2542.832	0.149	5.283463	0.155915	6.025	0.007
60	84	LDEGGWSGVENTDTSTGGSCKEGSY	24	2536.042	0.5	2543.490	0.025	5.94198	0.052442	6.021	0.006
60	84	LDEGGWSGVENTDTSTGGSCKEGSY	24	2536.042	1	2543.754	0.085	6.205808	0.096484	6.026	0.008
60	84	LDEGGWSGVENTDTSTGGSCKEGSY	24	2536.042	2	2544.079	0.015	6.530341	0.048544	6.025	0.009

Start	Ende	Sequenz	MaxUptake	MHP	Exposure	Center	Center SD	Uptake	Uptake SD	RT	RT SD
60	84	LDEGGWSGVENTDTSTGGSCKEGSY	24	2536.042	5	2544.529	0.078	6.981116	0.090217	6.030	0.011
61	67	DEGGWSG	6	707.263	0	707.546	0.036	0	0	5.451	0.005
61	67	DEGGWSG	6	707.263	0.25	708.861	0.007	1.315022	0.037006	5.453	0.004
61	67	DEGGWSG	6	707.263	0.5	708.918	0.031	1.372324	0.048	5.453	0.005
61	67	DEGGWSG	6	707.263	1	708.910	0.019	1.364152	0.041069	5.452	0.005
61	67	DEGGWSG	6	707.263	2	708.846	0.013	1.30003	0.038656	5.457	0.004
61	67	DEGGWSG	6	707.263	5	708.832	0.032	1.286301	0.048503	5.457	0.007
61	69	DEGGWSGVE	8	935.374	0	935.808	0.025	0	0	6.196	0.005
61	69	DEGGWSGVE	8	935.374	0.25	937.496	0.019	1.68736	0.03109	6.202	0.002
61	69	DEGGWSGVE	8	935.374	0.5	937.672	0.005	1.863379	0.025448	6.203	0.004
61	69	DEGGWSGVE	8	935.374	1	937.755	0.017	1.946813	0.030275	6.201	0.003
61	69	DEGGWSGVE	8	935.374	2	937.677	0.011	1.868533	0.027464	6.206	0.005
61	69	DEGGWSGVE	8	935.374	5	937.788	0.045	1.979376	0.051893	6.209	0.008
61	71	DEGGWSGVENT	10	1150.465	0	1151.123	0.027	0	0	5.966	0.007
61	71	DEGGWSGVENT	10	1150.465	0.25	1153.769	0.009	2.646031	0.028531	5.963	0.003
61	71	DEGGWSGVENT	10	1150.465	0.5	1153.989	0.006	2.866044	0.027738	5.963	0.004
61	71	DEGGWSGVENT	10	1150.465	1	1154.141	0.040	3.017295	0.048652	5.962	0.003
61	71	DEGGWSGVENT	10	1150.465	2	1154.042	0.039	2.918232	0.047542	5.967	0.004
61	71	DEGGWSGVENT	10	1150.465	5	1154.181	0.024	3.057301	0.036203	5.967	0.005
61	79	DEGGWSGVENTDTSTGGSC	18	1858.703	0	1859.730	0.106	0	0	6.012	0.006
61	79	DEGGWSGVENTDTSTGGSC	18	1858.703	0.25	1863.576	0.248	3.846262	0.269499	6.024	0.004
61	79	DEGGWSGVENTDTSTGGSC	18	1858.703	0.5	1863.906	0.188	4.176121	0.216203	6.020	0.008
61	79	DEGGWSGVENTDTSTGGSC	18	1858.703	1	1863.738	0.254	4.00847	0.27549	6.022	0.007
61	79	DEGGWSGVENTDTSTGGSC	18	1858.703	2	1864.108	0.047	4.378377	0.116088	6.030	0.004
61	79	DEGGWSGVENTDTSTGGSC	18	1858.703	5	1864.471	0.069	4.741812	0.12693	6.030	0.011
70	84	NTDTSTGGSCKEGSY	14	1506.601	0	1507.382	0.023	0	0	4.088	0.005
70	84	NTDTSTGGSCKEGSY	14	1506.601	0.25	1511.085	0.072	3.7027	0.075681	4.090	0.002
70	84	NTDTSTGGSCKEGSY	14	1506.601	0.5	1511.370	0.025	3.98807	0.033536	4.088	0.004
70	84	NTDTSTGGSCKEGSY	14	1506.601	1	1511.436	0.071	4.053285	0.074522	4.092	0.003
70	84	NTDTSTGGSCKEGSY	14	1506.601	2	1511.462	0.075	4.079483	0.078087	4.091	0.006
70	84	NTDTSTGGSCKEGSY	14	1506.601	5	1511.470	0.563	4.087412	0.563037	4.095	0.008
72	84	DTSTGGSCKEGSY	12	1291.511	0	1292.439	0.011	0	0	4.105	0.006
72	84	DTSTGGSCKEGSY	12	1291.511	0.25	1295.231	0.031	2.792104	0.033215	4.108	0.002
72	84	DTSTGGSCKEGSY	12	1291.511	0.5	1295.420	0.020	2.981259	0.022942	4.107	0.003
72	84	DTSTGGSCKEGSY	12	1291.511	1	1295.478	0.040	3.038575	0.041391	4.108	0.004
72	84	DTSTGGSCKEGSY	12	1291.511	2	1295.536	0.030	3.096996	0.031906	4.110	0.006
72	84	DTSTGGSCKEGSY	12	1291.511	5	1295.682	0.004	3.242509	0.011995	4.114	0.007
94	106	SKTQWPSDQPSDG	10	1432.634	0	1433.399	0.080	0	0	4.843	0.095
94	106	SKTQWPSDQPSDG	10	1432.634	0.25	1434.398	0.087	0.998866	0.117819	4.818	0.071
94	106	SKTQWPSDQPSDG	10	1432.634	0.5	1434.438	0.133	1.038904	0.155458	4.878	0.106
94	106	SKTQWPSDQPSDG	10	1432.634	1	1434.546	0.052	1.147103	0.095581	4.789	0.006
94	106	SKTQWPSDQPSDG	10	1432.634	2	1434.234	0.038	0.835287	0.088437	5.020	0.005
94	106	SKTQWPSDQPSDG	10	1432.634	5	1434.334	0.394	0.935226	0.402442	4.838	0.082
94	112	SKTQWPSDQPSDGRSIGGL	16	2015.978	0	2017.094	0.046	0	0	5.764	0.005
94	112	SKTQWPSDQPSDGRSIGGL	16	2015.978	0.25	2018.192	0.053	1.098452	0.070099	5.765	0.003
94	112	SKTQWPSDQPSDGRSIGGL	16	2015.978	0.5	2018.405	0.045	1.31113	0.064475	5.768	0.003
94	112	SKTQWPSDQPSDGRSIGGL	16	2015.978	1	2018.396	0.077	1.302326	0.089822	5.767	0.003
94	112	SKTQWPSDQPSDGRSIGGL	16	2015.978	2	2018.481	0.038	1.386945	0.060095	5.768	0.006
94	112	SKTQWPSDQPSDGRSIGGL	16	2015.978	5	2018.607	0.300	1.513566	0.303617	5.772	0.007
95	106	KTQWPSDQPSDG	9	1345.602	0	1346.341	0.006	0	0	4.789	0.005
95	106	KTQWPSDQPSDG	9	1345.602	0.25	1347.211	0.018	0.870715	0.019178	4.792	0.003
95	106	KTQWPSDQPSDG	9	1345.602	0.5	1347.351	0.022	1.010414	0.023306	4.789	0.005
95	106	KTQWPSDQPSDG	9	1345.602	1	1347.323	0.054	0.982903	0.054508	4.790	0.005
95	106	KTQWPSDQPSDG	9	1345.602	2	1347.411	0.025	1.070808	0.025588	4.793	0.005
95	106	KTQWPSDQPSDG	9	1345.602	5	1347.500	0.149	1.159602	0.149498	4.794	0.007
95	108	KTQWPSDQPSDGRS	11	1588.735	0	1589.438	0.067	0	0	4.400	0.009
95	108	KTQWPSDQPSDGRS	11	1588.735	0.25	1590.502	0.120	1.064412	0.137297	4.411	0.007
95	108	KTQWPSDQPSDGRS	11	1588.735	0.5	1590.622	0.123	1.184274	0.140101	4.405	0.005
95	108	KTQWPSDQPSDGRS	11	1588.735	1	1590.623	0.087	1.185112	0.109426	4.412	0.003
95	108	KTQWPSDQPSDGRS	11	1588.735	2	1590.648	0.039	1.209836	0.077145	4.413	0.006
95	108	KTQWPSDQPSDGRS	11	1588.735	5	1590.785	0.060	1.346974	0.089977	4.409	0.013
95	112	KTQWPSDQPSDGRSIGGL	15	1928.946	0	1930.026	0.049	0	0	5.772	0.008
95	112	KTQWPSDQPSDGRSIGGL	15	1928.946	0.25	1931.067	0.062	1.040831	0.078463	5.777	0.006
95	112	KTQWPSDQPSDGRSIGGL	15	1928.946	0.5	1931.272	0.034	1.245251	0.059512	5.778	0.005
95	112	KTQWPSDQPSDGRSIGGL	15	1928.946	1	1931.280	0.085	1.2538	0.098087	5.779	0.006
95	112	KTQWPSDQPSDGRSIGGL	15	1928.946	2	1931.355	0.066	1.328404	0.082014	5.780	0.008
95	112	KTQWPSDQPSDGRSIGGL	15	1928.946	5	1931.163	0.400	1.136529	0.403204	5.786	0.008
95	113	KTQWPSDQPSDGRSIGGL	16	2042.030	0	2043.041	0.104	0	0	6.494	0.052
95	113	KTQWPSDQPSDGRSIGGL	16	2042.030	0.25	2044.409	0.058	1.368075	0.118885	6.486	0.005
95	113	KTQWPSDQPSDGRSIGGL	16	2042.030	0.5	2044.711	0.143	1.670758	0.176592	6.484	0.007
95	113	KTQWPSDQPSDGRSIGGL	16	2042.030	1	2044.691	0.014	1.650665	0.104988	6.486	0.004
95	113	KTQWPSDQPSDGRSIGGL	16	2042.030	2	2044.958	0.075	1.917664	0.128452	6.487	0.006
95	113	KTQWPSDQPSDGRSIGGL	16	2042.030	5	2044.956	0.000	1.915068	0.104027	6.485	0.000
120	128	YRSNTDDY	8	1134.470	0	1135.339	0.109	0	0	4.284	0.005
120	128	YRSNTDDY	8	1134.470	0.25	1135.930	0.047	0.590989	0.118452	4.288	0.003
120	128	YRSNTDDY	8	1134.470	0.5	1136.091	0.054	0.751493	0.121271	4.292	0.004
120	128	YRSNTDDY	8	1134.470	1	1136.194	0.044	0.854678	0.11747	4.290	0.004
120	128	YRSNTDDY	8	1134.470	2	1136.300	0.044	0.961129	0.11749	4.293	0.004
120	128	YRSNTDDY	8	1134.470	5	1136.429	0.054	1.089424	0.121446	4.294	0.005
132	137	WGVDA	5	618.288	0	618.777	0.014	0	0	6.132	0.006
132	137	WGVDA	5	618.288	0.25	619.713	0.005	0.935176	0.014672	6.136	0.002
132	137	WGVDA	5	618.288	0.5	619.889	0.010	1.11129	0.017092	6.136	0.003
132	137	WGVDA	5	618.288	1	619.993	0.028	1.215205	0.031014	6.134	0.003
132	137	WGVDA	5	618.288	2	619.929	0.009	1.151399	0.016145	6.139	0.004
132	137	WGVDA	5	618.288	5	619.941	0.005	1.1634	0.014495	6.139	0.007
138	142	YVSE	4	596.293	0	596.745	0.037	0	0	4.746	0.005
138	142	YVSE	4	596.293	0.25	597.093	0.034	0.34835	0.049973	4.749	0.001
138	142	YVSE	4	596.293	0.5	597.143	0.017	0.397684	0.040504	4.750	0.002
138	142	YVSE	4	596.293	1	597.157	0.014	0.411827	0.03965	4.749	0.004
138	142	YVSE	4	596.293	2	597.187	0.022	0.44229	0.043138	4.750	0.004
138	142	YVSE	4	596.293	5	597.077	0.080	0.331699	0.08853	4.755	0.005
138	143	YVSEL	5	709.377	0	709.887	0.025	0	0	6.561	0.006
138	143	YVSEL	5	709.377	0.25	709.939	0.089	0.051824	0.092437	6.151	0.003
138	143	YVSEL	5	709.377	0.5	709.994	0.087	0.107203	0.09092	6.155	0.002
138	143	YVSEL	5	709.377	1	709.955	0.045	0.068089	0.051272	6.154	0.003
138	143	YVSEL	5	709.377	2	710.647	0.101	0.760222	0.103862	6.549	0.059
138	143	YVSEL	5	709.377	5	710.156	0.012	0.268465	0.028079	6.543	0.106

Start	Ende	Sequenz	MaxUptake	MHP	Exposure	Center	Center SD	Uptake	Uptake SD	RT	RT SD
138	146	YVVSELSND	8	1025.479	0	1026.006	0.055	0	0	5.778	0.005
138	146	YVVSELSND	8	1025.479	0.25	1026.721	0.015	0.715747	0.056963	5.783	0.001
138	146	YVVSELSND	8	1025.479	0.5	1026.807	0.010	0.800857	0.055896	5.785	0.004
138	146	YVVSELSND	8	1025.479	1	1026.855	0.059	0.849239	0.080764	5.784	0.005
138	146	YVVSELSND	8	1025.479	2	1027.029	0.003	1.023134	0.055049	5.788	0.007
138	146	YVVSELSND	8	1025.479	5	1027.207	0.188	1.201235	0.195688	5.791	0.006
139	143	VVSEL	4	546.313	0	546.794	0.015	0	0	5.470	0.004
139	143	VVSEL	4	546.313	0.25	547.277	0.011	0.483016	0.018672	5.474	0.003
139	143	VVSEL	4	546.313	0.5	547.311	0.014	0.516379	0.020493	5.474	0.004
139	143	VVSEL	4	546.313	1	547.292	0.027	0.497394	0.030774	5.474	0.004
139	143	VVSEL	4	546.313	2	547.293	0.009	0.498757	0.017897	5.476	0.005
139	143	VVSEL	4	546.313	5	547.164	0.067	0.369469	0.06878	5.480	0.005
139	146	VVSELSND	7	862.415	0	862.877	0.015	0	0	4.703	0.004
139	146	VVSELSND	7	862.415	0.25	863.799	0.009	0.921922	0.017184	4.713	0.002
139	146	VVSELSND	7	862.415	0.5	863.873	0.011	0.995782	0.018208	4.713	0.003
139	146	VVSELSND	7	862.415	1	863.906	0.020	1.028644	0.024757	4.715	0.003
139	146	VVSELSND	7	862.415	2	864.033	0.015	1.155822	0.021236	4.715	0.003
139	146	VVSELSND	7	862.415	5	864.251	0.003	1.374447	0.0151	4.718	0.004
147	159	VAICRTDYPGTEN	11	1438.663	0	1439.423	0.023	0	0	5.032	0.005
147	159	VAICRTDYPGTEN	11	1438.663	0.25	1442.339	0.064	2.916622	0.067709	5.033	0.001
147	159	VAICRTDYPGTEN	11	1438.663	0.5	1442.387	0.076	2.964643	0.079782	5.034	0.003
147	159	VAICRTDYPGTEN	11	1438.663	1	1442.327	0.084	2.904825	0.086768	5.032	0.003
147	159	VAICRTDYPGTEN	11	1438.663	2	1442.230	0.027	2.807972	0.035523	5.034	0.005
147	159	VAICRTDYPGTEN	11	1438.663	5	1441.897	0.138	2.4745	0.139503	5.041	0.003
147	160	VAICRTDYPGTENM	12	1569.704	0	1570.702	0.011	0	0	5.734	0.009
147	160	VAICRTDYPGTENM	12	1569.704	0.25	1576.450	0.052	5.748035	0.053359	5.734	0.005
147	160	VAICRTDYPGTENM	12	1569.704	0.5	1576.874	0.050	6.172105	0.051626	5.733	0.005
147	160	VAICRTDYPGTENM	12	1569.704	1	1577.157	0.046	6.454993	0.047587	5.734	0.004
147	160	VAICRTDYPGTENM	12	1569.704	2	1577.214	0.015	6.511859	0.018404	5.739	0.004
147	160	VAICRTDYPGTENM	12	1569.704	5	1577.235	0.104	6.532902	0.104208	5.737	0.006
149	160	ICRTDYPGTENM	10	1399.598	0	1400.464	0.017	0	0	5.327	0.005
149	160	ICRTDYPGTENM	10	1399.598	0.25	1404.729	0.019	4.264902	0.025748	5.319	0.005
149	160	ICRTDYPGTENM	10	1399.598	0.5	1405.003	0.072	4.538848	0.074242	5.319	0.006
149	160	ICRTDYPGTENM	10	1399.598	1	1405.093	0.055	4.628977	0.057402	5.320	0.006
149	160	ICRTDYPGTENM	10	1399.598	2	1405.161	0.017	4.697149	0.024395	5.325	0.009
149	160	ICRTDYPGTENM	10	1399.598	5	1405.259	0.036	4.794826	0.039826	5.326	0.010
151	160	RTDYPGTENM	8	1183.505	0	1184.218	0.037	0	0	5.014	0.007
151	160	RTDYPGTENM	8	1183.505	0.25	1187.425	0.031	3.207259	0.048563	5.016	0.002
151	160	RTDYPGTENM	8	1183.505	0.5	1187.707	0.022	3.489675	0.043205	5.015	0.003
151	160	RTDYPGTENM	8	1183.505	1	1187.873	0.033	3.655378	0.050246	5.014	0.004
151	160	RTDYPGTENM	8	1183.505	2	1187.920	0.025	3.702256	0.044858	5.017	0.006
151	160	RTDYPGTENM	8	1183.505	5	1187.950	0.053	3.732168	0.065084	5.020	0.005
160	165	MVIPTY	4	723.375	0	723.792	0.017	0	0	6.678	0.007
160	165	MVIPTY	4	723.375	0.25	723.867	0.031	0.074291	0.035985	6.692	0.006
160	165	MVIPTY	4	723.375	0.5	723.866	0.026	0.07393	0.031214	6.692	0.008
160	165	MVIPTY	4	723.375	1	723.865	0.035	0.072276	0.038865	6.694	0.004
160	165	MVIPTY	4	723.375	2	723.937	0.010	0.144675	0.020156	6.695	0.006
160	165	MVIPTY	4	723.375	5	723.917	0.011	0.124077	0.020878	6.700	0.004
160	175	MVIPTYVQAGDSLPLT	13	1704.888	0	1706.054	0.052	0	0	7.451	0.006
160	175	MVIPTYVQAGDSLPLT	13	1704.888	0.25	1706.161	0.031	0.106644	0.06078	7.456	0.004
160	175	MVIPTYVQAGDSLPLT	13	1704.888	0.5	1706.180	0.054	0.126182	0.075233	7.456	0.004
160	175	MVIPTYVQAGDSLPLT	13	1704.888	1	1706.154	0.023	0.099266	0.057137	7.461	0.004
160	175	MVIPTYVQAGDSLPLT	13	1704.888	2	1706.213	0.062	0.158322	0.081028	7.459	0.005
160	175	MVIPTYVQAGDSLPLT	13	1704.888	5	1706.216	0.088	0.161872	0.10261	7.465	0.006
160	176	MVIPTYVQAGDSLPLTV	14	1803.956	0	1805.079	0.012	0	0	7.931	0.007
160	176	MVIPTYVQAGDSLPLTV	14	1803.956	0.25	1805.117	0.015	0.037965	0.019013	7.934	0.003
160	176	MVIPTYVQAGDSLPLTV	14	1803.956	0.5	1805.146	0.006	0.066514	0.01321	7.934	0.005
160	176	MVIPTYVQAGDSLPLTV	14	1803.956	1	1805.144	0.008	0.065106	0.014331	7.936	0.004
160	176	MVIPTYVQAGDSLPLTV	14	1803.956	2	1805.196	0.010	0.117111	0.015595	7.936	0.004
160	176	MVIPTYVQAGDSLPLTV	14	1803.956	5	1805.239	0.005	0.159226	0.013021	7.941	0.005
160	179	MVIPTYVQAGDSLPLTVVDQ	17	2146.110	0	2147.309	0.024	0	0	7.738	0.007
160	179	MVIPTYVQAGDSLPLTVVDQ	17	2146.110	0.25	2147.502	0.029	0.192871	0.037685	7.741	0.003
160	179	MVIPTYVQAGDSLPLTVVDQ	17	2146.110	0.5	2147.516	0.069	0.206946	0.072735	7.745	0.003
160	179	MVIPTYVQAGDSLPLTVVDQ	17	2146.110	1	2147.530	0.048	0.22046	0.053657	7.747	0.003
160	179	MVIPTYVQAGDSLPLTVVDQ	17	2146.110	2	2147.621	0.088	0.311554	0.091606	7.745	0.006
160	179	MVIPTYVQAGDSLPLTVVDQ	17	2146.110	5	2147.822	0.090	0.512752	0.093542	7.753	0.008
160	181	MVIPTYVQAGDSLPLTVVDQDT	19	2362.185	0	2363.597	0.012	0	0	7.788	0.007
160	181	MVIPTYVQAGDSLPLTVVDQDT	19	2362.185	0.25	2363.796	0.018	0.198338	0.021699	7.791	0.002
160	181	MVIPTYVQAGDSLPLTVVDQDT	19	2362.185	0.5	2363.827	0.006	0.229947	0.013273	7.794	0.004
160	181	MVIPTYVQAGDSLPLTVVDQDT	19	2362.185	1	2363.910	0.009	0.313133	0.015166	7.795	0.003
160	181	MVIPTYVQAGDSLPLTVVDQDT	19	2362.185	2	2364.093	0.008	0.495697	0.014421	7.793	0.006
160	181	MVIPTYVQAGDSLPLTVVDQDT	19	2362.185	5	2364.455	0.168	0.857987	0.168119	7.804	0.007
160	182	MVIPTYVQAGDSLPLTVVDQDTY	20	2525.248	0	2526.775	0.079	0	0	8.021	0.011
160	182	MVIPTYVQAGDSLPLTVVDQDTY	20	2525.248	0.25	2526.943	0.048	0.168367	0.092098	8.036	0.004
160	182	MVIPTYVQAGDSLPLTVVDQDTY	20	2525.248	0.5	2526.998	0.041	0.223419	0.088619	8.033	0.005
160	182	MVIPTYVQAGDSLPLTVVDQDTY	20	2525.248	1	2526.998	0.131	0.223762	0.152908	8.036	0.006
160	182	MVIPTYVQAGDSLPLTVVDQDTY	20	2525.248	2	2527.258	0.071	0.483717	0.106288	8.038	0.004
160	182	MVIPTYVQAGDSLPLTVVDQDTY	20	2525.248	5	2527.623	0.189	0.848805	0.204599	8.043	0.006
161	175	VIPTYVQAGDSLPLT	12	1573.847	0	1574.730	0.016	0	0	6.957	0.006
161	175	VIPTYVQAGDSLPLT	12	1573.847	0.25	1575.351	0.015	0.621105	0.021596	6.964	0.003
161	175	VIPTYVQAGDSLPLT	12	1573.847	0.5	1575.217	0.237	0.487275	0.237724	6.964	0.006
161	175	VIPTYVQAGDSLPLT	12	1573.847	1	1575.108	0.301	0.377641	0.301382	6.967	0.002
161	175	VIPTYVQAGDSLPLT	12	1573.847	2	1575.261	0.245	0.530981	0.245241	6.966	0.006
161	175	VIPTYVQAGDSLPLT	12	1573.847	5	1574.959	0.025	0.228842	0.029415	6.971	0.007
161	176	VIPTYVQAGDSLPLTV	13	1672.916	0	1673.825	0.121	0	0	7.537	0.005
161	176	VIPTYVQAGDSLPLTV	13	1672.916	0.25	1673.955	0.030	0.129731	0.124351	7.541	0.003
161	176	VIPTYVQAGDSLPLTV	13	1672.916	0.5	1673.944	0.033	0.118472	0.124989	7.540	0.005
161	176	VIPTYVQAGDSLPLTV	13	1672.916	1	1673.980	0.041	0.154503	0.127319	7.544	0.004
161	176	VIPTYVQAGDSLPLTV	13	1672.916	2	1673.982	0.045	0.157324	0.128766	7.545	0.004
161	176	VIPTYVQAGDSLPLTV	13	1672.916	5	1674.037	0.021	0.212357	0.122554	7.550	0.007
166	176	VQAGDSLPLTV	9	1099.599	0	1100.102	0.082	0	0	6.825	0.004
166	176	VQAGDSLPLTV	9	1099.599	0.25	1100.266	0.078	0.163212	0.11295	6.830	0.004
166	176	VQAGDSLPLTV	9	1099.599	0.5	1100.290	0.013	0.18739	0.082778	6.832	0.005
166	176	VQAGDSLPLTV	9	1099.599	1	1100.303	0.060	0.200715	0.101215	6.830	0.004
166	176	VQAGDSLPLTV	9	1099.599	2	1100.346	0.001	0.243877	0.081782	6.832	0.006
166	176	VQAGDSLPLTV	9	1099.599	5	1100.381	0.053	0.278977	0.097253	6.835	0.007
166	182	VQAGDSLPLTVVDQDTY	15	1820.891	0	1821.854	0.042	0	0	7.170	0.009

Start	Ende	Sequenz	MaxUptake	MHP	Exposure	Center	Center SD	Uptake	Uptake SD	RT	RT SD
166	182	VQAGDSLPLTVVDQDTY	15	1820.891	0.25	1822.126	0.024	0.271364	0.047789	7.172	0.002
166	182	VQAGDSLPLTVVDQDTY	15	1820.891	0.5	1822.112	0.015	0.257082	0.044075	7.170	0.003
166	182	VQAGDSLPLTVVDQDTY	15	1820.891	1	1822.224	0.055	0.36998	0.069226	7.175	0.006
166	182	VQAGDSLPLTVVDQDTY	15	1820.891	2	1822.393	0.025	0.538619	0.048698	7.175	0.002
166	182	VQAGDSLPLTVVDQDTY	15	1820.891	5	1822.750	0.190	0.895485	0.19434	7.180	0.006
174	185	LTVDQDQTYTYW	11	1503.700	0	1504.632	0.014	0	0	5.948	0.003
174	185	LTVDQDQTYTYW	11	1503.700	0.25	1510.072	0.043	5.439291	0.044951	5.930	0.001
174	185	LTVDQDQTYTYW	11	1503.700	0.5	1510.514	0.183	5.881457	0.183805	5.929	0.003
174	185	LTVDQDQTYTYW	11	1503.700	1	1510.732	0.098	6.100042	0.099292	5.927	0.003
174	185	LTVDQDQTYTYW	11	1503.700	2	1511.004	0.047	6.37158	0.048857	5.928	0.005
174	185	LTVDQDQTYTYW	11	1503.700	5	1511.081	0.206	6.448237	0.206125	5.930	0.006
176	182	VVDQDTY	6	839.378	0	839.824	0.048	0	0	4.766	0.005
176	182	VVDQDTY	6	839.378	0.25	840.025	0.042	0.201453	0.063663	4.768	0.003
176	182	VVDQDTY	6	839.378	0.5	840.097	0.034	0.273202	0.058973	4.769	0.002
176	182	VVDQDTY	6	839.378	1	840.169	0.051	0.345147	0.069891	4.770	0.004
176	182	VVDQDTY	6	839.378	2	840.380	0.046	0.556212	0.066392	4.770	0.004
176	182	VVDQDTY	6	839.378	5	840.647	0.187	0.823813	0.193086	4.774	0.004
177	182	VDQDTY	5	740.310	0	740.706	0.006	0	0	4.498	0.004
177	182	VDQDTY	5	740.310	0.25	740.814	0.005	0.108494	0.008285	4.506	0.002
177	182	VDQDTY	5	740.310	0.5	740.880	0.010	0.17487	0.011703	4.509	0.003
177	182	VDQDTY	5	740.310	1	740.904	0.011	0.198221	0.012349	4.508	0.005
177	182	VDQDTY	5	740.310	2	741.035	0.015	0.329797	0.016686	4.509	0.004
177	182	VDQDTY	5	740.310	5	741.212	0.094	0.506262	0.094575	4.511	0.007
182	194	YTTWQGLKTSAQY	12	1608.769	0	1609.875	0.086	0	0	6.755	0.006
182	194	YTTWQGLKTSAQY	12	1608.769	0.25	1611.430	0.025	1.555194	0.089766	6.758	0.002
182	194	YTTWQGLKTSAQY	12	1608.769	0.5	1612.166	0.029	2.290832	0.091166	6.757	0.004
182	194	YTTWQGLKTSAQY	12	1608.769	1	1612.869	0.045	2.994636	0.097305	6.759	0.006
182	194	YTTWQGLKTSAQY	12	1608.769	2	1613.631	0.035	3.756459	0.093145	6.759	0.004
182	194	YTTWQGLKTSAQY	12	1608.769	5	1614.453	0.041	4.577816	0.095758	6.765	0.006
183	188	YTWQGL	5	767.372	0	767.759	0.011	0	0	7.521	0.008
183	188	YTWQGL	5	767.372	0.25	768.754	0.005	0.995318	0.011867	7.529	0.002
183	188	YTWQGL	5	767.372	0.5	769.154	0.008	1.395199	0.013236	7.529	0.003
183	188	YTWQGL	5	767.372	1	769.400	0.015	1.641327	0.018111	7.531	0.002
183	188	YTWQGL	5	767.372	2	769.642	0.012	1.883154	0.016226	7.530	0.005
183	188	YTWQGL	5	767.372	5	769.980	0.014	2.221552	0.017247	7.536	0.007
183	190	YTWQGLKT	7	996.515	0	997.134	0.083	0	0	6.165	0.006
183	190	YTWQGLKT	7	996.515	0.25	998.519	0.028	1.385381	0.087241	6.170	0.004
183	190	YTWQGLKT	7	996.515	0.5	999.071	0.043	1.937127	0.093357	6.169	0.005
183	190	YTWQGLKT	7	996.515	1	999.584	0.038	2.450274	0.091182	6.170	0.004
183	190	YTWQGLKT	7	996.515	2	1000.020	0.039	2.886229	0.091296	6.171	0.005
183	190	YTWQGLKT	7	996.515	5	1000.568	0.160	3.434143	0.180478	6.176	0.007
183	193	YTWQGLKTSAQ	10	1282.643	0	1283.728	0.111	0	0	5.935	0.004
183	193	YTWQGLKTSAQ	10	1282.643	0.25	1285.109	0.058	1.381263	0.124868	5.935	0.001
183	193	YTWQGLKTSAQ	10	1282.643	0.5	1285.760	0.059	2.032159	0.125497	5.934	0.004
183	193	YTWQGLKTSAQ	10	1282.643	1	1286.296	0.100	2.568462	0.148802	5.934	0.003
183	193	YTWQGLKTSAQ	10	1282.643	2	1286.891	0.087	3.162831	0.140728	5.936	0.004
183	193	YTWQGLKTSAQ	10	1282.643	5	1287.595	0.018	3.867495	0.112144	5.937	0.005
183	194	YTWQGLKTSAQY	11	1445.706	0	1446.963	0.164	0	0	6.382	0.005
183	194	YTWQGLKTSAQY	11	1445.706	0.25	1448.292	0.124	1.328471	0.205573	6.386	0.002
183	194	YTWQGLKTSAQY	11	1445.706	0.5	1448.909	0.145	1.945384	0.218591	6.388	0.001
183	194	YTWQGLKTSAQY	11	1445.706	1	1449.450	0.156	2.486828	0.226604	6.384	0.005
183	194	YTWQGLKTSAQY	11	1445.706	2	1450.028	0.131	3.064924	0.209586	6.383	0.000
183	194	YTWQGLKTSAQY	11	1445.706	5	1450.774	0.266	3.810324	0.312365	6.392	0.008
184	193	TWQGLKTSAQ	9	1119.579	0	1120.157	0.038	0	0	5.238	0.006
184	193	TWQGLKTSAQ	9	1119.579	0.25	1121.652	0.021	1.495413	0.043539	5.245	0.000
184	193	TWQGLKTSAQ	9	1119.579	0.5	1122.284	0.024	2.126922	0.045068	5.240	0.004
184	193	TWQGLKTSAQ	9	1119.579	1	1122.844	0.059	2.687541	0.070629	5.240	0.004
184	193	TWQGLKTSAQ	9	1119.579	2	1123.403	0.026	3.246273	0.045893	5.242	0.001
184	193	TWQGLKTSAQ	9	1119.579	5	1123.999	0.059	3.842037	0.070413	5.251	0.001
194	202	YVNNAGIS	8	1000.473	0	1000.963	0.033	0	0	5.489	0.006
194	202	YVNNAGIS	8	1000.473	0.25	1001.217	0.041	0.254487	0.05272	5.498	0.003
194	202	YVNNAGIS	8	1000.473	0.5	1001.286	0.046	0.32379	0.056479	5.495	0.006
194	202	YVNNAGIS	8	1000.473	1	1001.386	0.040	0.423521	0.051801	5.497	0.005
194	202	YVNNAGIS	8	1000.473	2	1001.569	0.053	0.60644	0.062414	5.500	0.006
194	202	YVNNAGIS	8	1000.473	5	1001.790	0.066	0.827062	0.07354	5.501	0.008
194	204	YVNNAGISVE	10	1228.584	0	1229.342	0.040	0	0	5.995	0.005
194	204	YVNNAGISVE	10	1228.584	0.25	1229.534	0.019	0.192044	0.044489	6.006	0.003
194	204	YVNNAGISVE	10	1228.584	0.5	1229.611	0.012	0.26846	0.041986	6.009	0.001
194	204	YVNNAGISVE	10	1228.584	1	1229.723	0.014	0.381202	0.042657	6.006	0.003
194	204	YVNNAGISVE	10	1228.584	2	1229.935	0.010	0.592927	0.0415	6.005	0.001
194	204	YVNNAGISVE	10	1228.584	5	1230.115	0.155	0.773246	0.15971	6.014	0.009
195	202	YVNNAGIS	7	837.410	0	837.847	0.027	0	0	4.576	0.005
195	202	YVNNAGIS	7	837.410	0.25	838.060	0.034	0.212853	0.043078	4.575	0.003
195	202	YVNNAGIS	7	837.410	0.5	838.149	0.033	0.301984	0.042766	4.575	0.003
195	202	YVNNAGIS	7	837.410	1	838.235	0.041	0.388144	0.048964	4.576	0.006
195	202	YVNNAGIS	7	837.410	2	838.416	0.061	0.568681	0.066619	4.577	0.005
195	202	YVNNAGIS	7	837.410	5	838.585	0.164	0.737876	0.165836	4.579	0.007
195	203	YVNNAGISV	8	936.479	0	936.933	0.018	0	0	5.761	0.004
195	203	YVNNAGISV	8	936.479	0.25	937.148	0.021	0.215316	0.027242	5.766	0.001
195	203	YVNNAGISV	8	936.479	0.5	937.254	0.003	0.32155	0.017926	5.767	0.003
195	203	YVNNAGISV	8	936.479	1	937.383	0.017	0.449877	0.024611	5.766	0.005
195	203	YVNNAGISV	8	936.479	2	937.594	0.011	0.661193	0.020649	5.770	0.007
195	203	YVNNAGISV	8	936.479	5	937.861	0.008	0.928693	0.019419	5.771	0.007
195	204	YVNNAGISVE	9	1065.521	0	1066.122	0.040	0	0	5.359	0.005
195	204	YVNNAGISVE	9	1065.521	0.25	1066.323	0.010	0.200175	0.041097	5.374	0.003
195	204	YVNNAGISVE	9	1065.521	0.5	1066.406	0.016	0.283981	0.042979	5.372	0.004
195	204	YVNNAGISVE	9	1065.521	1	1066.495	0.027	0.372185	0.047967	5.371	0.003
195	204	YVNNAGISVE	9	1065.521	2	1066.705	0.013	0.582363	0.041864	5.370	0.002
195	204	YVNNAGISVE	9	1065.521	5	1066.878	0.171	0.755669	0.175541	5.378	0.006
204	211	EDACVWGS	7	866.335	0	866.729	0.031	0	0	5.001	0.004
204	211	EDACVWGS	7	866.335	0.25	867.168	0.043	0.439858	0.053083	5.011	0.004
204	211	EDACVWGS	7	866.335	0.5	867.287	0.064	0.558906	0.070892	5.009	0.006
204	211	EDACVWGS	7	866.335	1	867.401	0.075	0.67267	0.081067	5.010	0.006
204	211	EDACVWGS	7	866.335	2	867.615	0.053	0.88623	0.061254	5.014	0.006
204	211	EDACVWGS	7	866.335	5	867.803	0.110	1.074075	0.114803	5.014	0.009
207	214	CVWGSSSS	7	812.324	0	812.967	0.058	0	0	5.567	0.005
207	214	CVWGSSSS	7	812.324	0.25	814.074	0.069	1.107345	0.090182	5.563	0.004

Start	Ende	Sequenz	MaxUptake	MHP	Exposure	Center	Center SD	Uptake	Uptake SD	RT	RT SD
207	214	CVWGSSSS	7	812.324	0.5	814.140	0.076	1.172798	0.095795	5.562	0.002
207	214	CVWGSSSS	7	812.324	1	814.155	0.078	1.188601	0.097095	5.560	0.004
207	214	CVWGSSSS	7	812.324	2	814.186	0.071	1.218876	0.091738	5.563	0.005
207	214	CVWGSSSS	7	812.324	5	814.084	0.116	1.116964	0.129304	5.566	0.005
220	224	APLNF	3	561.303	0	561.590	0.011	0	0	6.734	0.006
220	224	APLNF	3	561.303	0.25	561.615	0.008	0.024254	0.013747	6.740	0.004
220	224	APLNF	3	561.303	0.5	561.635	0.001	0.044719	0.010988	6.739	0.005
220	224	APLNF	3	561.303	1	561.645	0.011	0.054702	0.015408	6.738	0.004
220	224	APLNF	3	561.303	2	561.661	0.009	0.070349	0.014078	6.740	0.006
220	224	APLNF	3	561.303	5	561.637	0.014	0.046473	0.017972	6.747	0.006
225	234	GAGSSDGVAY	9	883.379	0	883.927	0.033	0	0	5.012	0.007
225	234	GAGSSDGVAY	9	883.379	0.25	884.279	0.035	0.352305	0.047614	5.020	0.003
225	234	GAGSSDGVAY	9	883.379	0.5	884.350	0.040	0.42314	0.051311	5.019	0.006
225	234	GAGSSDGVAY	9	883.379	1	884.466	0.053	0.53934	0.061842	5.019	0.006
225	234	GAGSSDGVAY	9	883.379	2	884.602	0.046	0.675072	0.056466	5.024	0.005
225	234	GAGSSDGVAY	9	883.379	5	884.686	0.167	0.759577	0.1698	5.025	0.009
225	235	GAGSSDGVAYL	10	996.463	0	997.015	0.061	0	0	6.494	0.004
225	235	GAGSSDGVAYL	10	996.463	0.25	997.310	0.064	0.294744	0.088382	6.503	0.004
225	235	GAGSSDGVAYL	10	996.463	0.5	997.399	0.087	0.383821	0.106519	6.500	0.005
225	235	GAGSSDGVAYL	10	996.463	1	997.509	0.086	0.494075	0.105166	6.503	0.004
225	235	GAGSSDGVAYL	10	996.463	2	997.691	0.020	0.67592	0.064286	6.502	0.005
225	235	GAGSSDGVAYL	10	996.463	5	997.755	0.145	0.740351	0.157614	6.508	0.006
235	249	LSLIPNPNNGNALNF	12	1597.833	0	1598.929	0.030	0	0	7.879	0.007
235	249	LSLIPNPNNGNALNF	12	1597.833	0.25	1599.354	0.015	0.425118	0.033283	7.887	0.001
235	249	LSLIPNPNNGNALNF	12	1597.833	0.5	1599.419	0.019	0.490086	0.035024	7.885	0.005
235	249	LSLIPNPNNGNALNF	12	1597.833	1	1599.421	0.024	0.492122	0.038371	7.888	0.005
235	249	LSLIPNPNNGNALNF	12	1597.833	2	1599.567	0.015	0.638579	0.033187	7.887	0.006
235	249	LSLIPNPNNGNALNF	12	1597.833	5	1599.767	0.002	0.83836	0.029624	7.893	0.006
236	249	SLIPNPNNGNALNF	11	1484.749	0	1485.988	0.084	0	0	7.396	0.005
236	249	SLIPNPNNGNALNF	11	1484.749	0.25	1486.565	0.010	0.577417	0.084323	7.401	0.003
236	249	SLIPNPNNGNALNF	11	1484.749	0.5	1486.700	0.032	0.71258	0.08951	7.402	0.003
236	249	SLIPNPNNGNALNF	11	1484.749	1	1486.742	0.027	0.754773	0.08801	7.405	0.001
236	249	SLIPNPNNGNALNF	11	1484.749	2	1486.888	0.032	0.900173	0.089695	7.405	0.005
236	249	SLIPNPNNGNALNF	11	1484.749	5	1486.963	0.255	0.974802	0.026833	7.409	0.006
238	247	IPNPNNGNAL	7	1023.522	0	1024.440	0.140	0	0	6.939	0.006
238	247	IPNPNNGNAL	7	1023.522	0.25	1024.873	0.120	0.433693	0.184305	6.945	0.003
238	247	IPNPNNGNAL	7	1023.522	0.5	1024.934	0.130	0.494444	0.191215	6.944	0.005
238	247	IPNPNNGNAL	7	1023.522	1	1024.918	0.091	0.478484	0.167294	6.947	0.003
238	247	IPNPNNGNAL	7	1023.522	2	1025.016	0.085	0.57597	0.164015	6.946	0.005
238	247	IPNPNNGNAL	7	1023.522	5	1025.079	0.165	0.639156	0.216494	6.951	0.007
238	249	IPNPNNGNALNF	9	1284.633	0	1285.340	0.020	0	0	6.726	0.006
238	249	IPNPNNGNALNF	9	1284.633	0.25	1286.011	0.023	0.670751	0.031003	6.733	0.002
238	249	IPNPNNGNALNF	9	1284.633	0.5	1286.147	0.019	0.807386	0.027575	6.731	0.004
238	249	IPNPNNGNALNF	9	1284.633	1	1286.276	0.024	0.936117	0.031789	6.733	0.005
238	249	IPNPNNGNALNF	9	1284.633	2	1286.410	0.027	1.069631	0.033975	6.735	0.005
238	249	IPNPNNGNALNF	9	1284.633	5	1286.575	0.189	1.235277	0.19045	6.740	0.006
239	247	PNPNNNGNAL	6	910.438	0	911.291	0.012	0	0	6.602	0.004
239	247	PNPNNNGNAL	6	910.438	0.25	911.652	0.026	0.361133	0.028701	6.603	0.002
239	247	PNPNNNGNAL	6	910.438	0.5	911.664	0.015	0.37251	0.018993	6.602	0.003
239	247	PNPNNNGNAL	6	910.438	1	911.706	0.019	0.41503	0.02251	6.602	0.005
239	247	PNPNNNGNAL	6	910.438	2	911.790	0.012	0.498397	0.017033	6.605	0.004
239	247	PNPNNNGNAL	6	910.438	5	911.940	0.009	0.64847	0.014754	6.608	0.006
250	255	NVKIVA	5	643.414	0	643.799	0.012	0	0	4.478	0.003
250	255	NVKIVA	5	643.414	0.25	643.856	0.010	0.056976	0.015562	4.482	0.002
250	255	NVKIVA	5	643.414	0.5	643.882	0.001	0.083852	0.012229	4.487	0.004
250	255	NVKIVA	5	643.414	1	643.853	0.014	0.054674	0.018934	4.485	0.005
250	255	NVKIVA	5	643.414	2	643.893	0.010	0.094413	0.015651	4.486	0.004
250	255	NVKIVA	5	643.414	5	643.930	0.052	0.131447	0.053126	4.489	0.005
250	256	NVKIVAA	6	714.451	0	714.829	0.022	0	0	4.392	0.005
250	256	NVKIVAA	6	714.451	0.25	714.981	0.025	0.152269	0.033338	4.397	0.003
250	256	NVKIVAA	6	714.451	0.5	714.960	0.016	0.131008	0.02692	4.400	0.004
250	256	NVKIVAA	6	714.451	1	714.992	0.031	0.163656	0.037848	4.398	0.006
250	256	NVKIVAA	6	714.451	2	715.033	0.038	0.204345	0.043363	4.400	0.005
250	256	NVKIVAA	6	714.451	5	715.079	0.047	0.250684	0.051643	4.404	0.006
250	257	NVKIVAAD	7	829.478	0	829.891	0.038	0	0	4.301	0.006
250	257	NVKIVAAD	7	829.478	0.25	830.076	0.014	0.185715	0.040569	4.308	0.003
250	257	NVKIVAAD	7	829.478	0.5	830.140	0.033	0.248883	0.050369	4.308	0.005
250	257	NVKIVAAD	7	829.478	1	830.162	0.026	0.271102	0.046084	4.310	0.005
250	257	NVKIVAAD	7	829.478	2	830.263	0.016	0.372473	0.041215	4.310	0.006
250	257	NVKIVAAD	7	829.478	5	830.412	0.101	0.521192	0.107598	4.314	0.006
250	258	NVKIVAADD	8	944.505	0	944.997	0.033	0	0	4.352	0.006
250	258	NVKIVAADD	8	944.505	0.25	945.379	0.017	0.381224	0.036971	4.356	0.004
250	258	NVKIVAADD	8	944.505	0.5	945.450	0.025	0.452816	0.041593	4.357	0.004
250	258	NVKIVAADD	8	944.505	1	945.465	0.021	0.46774	0.038897	4.359	0.005
250	258	NVKIVAADD	8	944.505	2	945.572	0.026	0.574993	0.041805	4.359	0.005
250	258	NVKIVAADD	8	944.505	5	945.693	0.112	0.695281	0.116994	4.362	0.007
250	260	NVKIVAADDSS	10	1118.569	0	1119.168	0.043	0	0	4.251	0.004
250	260	NVKIVAADDSS	10	1118.569	0.25	1119.785	0.060	0.616917	0.073856	4.253	0.002
250	260	NVKIVAADDSS	10	1118.569	0.5	1119.963	0.047	0.79492	0.063179	4.258	0.004
250	260	NVKIVAADDSS	10	1118.569	1	1120.081	0.048	0.912684	0.064125	4.254	0.003
250	260	NVKIVAADDSS	10	1118.569	2	1120.320	0.027	1.152047	0.050138	4.255	0.004
250	260	NVKIVAADDSS	10	1118.569	5	1120.600	0.025	1.432095	0.049524	4.260	0.004
250	264	NVKIVAADDSSTVNG	14	1489.749	0	1490.720	0.071	0	0	4.595	0.005
250	264	NVKIVAADDSSTVNG	14	1489.749	0.25	1491.633	0.068	0.912511	0.098553	4.592	0.001
250	264	NVKIVAADDSSTVNG	14	1489.749	0.5	1491.817	0.047	1.097181	0.085324	4.594	0.004
250	264	NVKIVAADDSSTVNG	14	1489.749	1	1491.961	0.046	1.240329	0.084811	4.591	0.003
250	264	NVKIVAADDSSTVNG	14	1489.749	2	1492.230	0.013	1.509397	0.072247	4.593	0.004
250	264	NVKIVAADDSSTVNG	14	1489.749	5	1492.663	0.030	1.942586	0.076946	4.597	0.004
289	294	AKFVLY	5	740.434	0	740.795	0.031	0	0	5.810	0.006
289	294	AKFVLY	5	740.434	0.25	742.048	0.099	1.253169	0.103638	5.814	0.004
289	294	AKFVLY	5	740.434	0.5	742.340	0.049	1.54512	0.057893	5.814	0.005
289	294	AKFVLY	5	740.434	1	742.608	0.078	1.813071	0.083937	5.815	0.005
289	294	AKFVLY	5	740.434	2	742.838	0.040	2.042628	0.051019	5.818	0.006
289	294	AKFVLY	5	740.434	5	743.310	0.009	2.515223	0.032634	5.818	0.008

Apo-ScSun4C pH8.0

Start	End	Sequence	MaxUptake	MHP	Exposure	Center	Center SD	Uptake	Uptake SD	RT	RT SD
11	18	SSGLVPRG	6	772.431	0	772.891	0.078	0	0	5.226	0.007
11	18	SSGLVPRG	6	772.431	0.25	776.295	0.049	3.404397	0.091717	5.221	0.004
11	18	SSGLVPRG	6	772.431	0.5	776.226	0.108	3.335421	0.13329	5.226	0.006
11	18	SSGLVPRG	6	772.431	1	776.290	0.045	3.399047	0.090005	5.231	0.004
11	18	SSGLVPRG	6	772.431	2	776.092	0.105	3.201326	0.130591	5.232	0.006
11	18	SSGLVPRG	6	772.431	5	776.143	0.051	3.252801	0.093157	5.229	0.007
11	28	SSGLVPRGSHNGSIYGD	16	1815.898	0	1817.012	0.060	0	0	6.8	0.009
11	28	SSGLVPRGSHNGSIYGD	16	1815.898	0.25	1822.870	0.105	5.858333	0.120968	6.807	2E-04
11	28	SSGLVPRGSHNGSIYGD	16	1815.898	0.5	1823.219	0.049	6.206974	0.077825	6.824	0.005
11	28	SSGLVPRGSHNGSIYGD	16	1815.898	1	1823.675	0.100	6.663308	0.116413	6.839	0.005
11	28	SSGLVPRGSHNGSIYGD	16	1815.898	2	1823.367	0.271	6.354567	0.278133	6.845	0.009
11	28	SSGLVPRGSHNGSIYGD	16	1815.898	5	1823.424	0.065	6.411848	0.088855	6.848	0.008
12	16	SGLVP	3	472.277	0	472.490	0.001	0	0	6.74	0.005
12	16	SGLVP	3	472.277	0.25	474.048	0.034	1.557455	0.034094	6.737	7E-04
12	16	SGLVP	3	472.277	0.5	473.971	0.045	1.480667	0.044521	6.742	0.007
12	16	SGLVP	3	472.277	1	473.996	0.002	1.505902	0.001952	6.748	0.003
12	16	SGLVP	3	472.277	2	473.917	0.056	1.426967	0.056443	6.749	0.004
12	16	SGLVP	3	472.277	5	473.931	0.019	1.440312	0.019171	6.742	0.007
12	18	SGLVPRG	5	685.399	0	685.971	0.062	0	0	5.239	0.008
12	18	SGLVPRG	5	685.399	0.25	688.588	0.021	2.617196	0.065382	5.233	0.004
12	18	SGLVPRG	5	685.399	0.5	688.503	0.124	2.532353	0.139045	5.24	0.005
12	18	SGLVPRG	5	685.399	1	688.578	0.020	2.60678	0.064984	5.243	0.004
12	18	SGLVPRG	5	685.399	2	688.399	0.105	2.427995	0.122023	5.245	0.005
12	18	SGLVPRG	5	685.399	5	688.469	0.025	2.49789	0.066642	5.244	0.006
12	27	SGLVPRGSHNGSIYGD	14	1615.782	0	1616.648	0.069	0	0	5.758	0.012
12	27	SGLVPRGSHNGSIYGD	14	1615.782	0.25	1622.017	0.009	5.369027	0.069214	5.767	0.003
12	27	SGLVPRGSHNGSIYGD	14	1615.782	0.5	1622.313	0.089	5.665707	0.112585	5.776	0.004
12	27	SGLVPRGSHNGSIYGD	14	1615.782	1	1622.968	0.035	6.319948	0.077135	5.783	8E-04
12	27	SGLVPRGSHNGSIYGD	14	1615.782	2	1622.572	0.175	5.92423	0.188005	5.779	0.002
12	27	SGLVPRGSHNGSIYGD	14	1615.782	5	1622.299	0.159	5.651671	0.173032	5.79	0.007
12	30	SGLVPRGSHNGSIYGD	17	1914.930	0	1916.033	0.081	0	0	6.612	0.005
12	30	SGLVPRGSHNGSIYGD	17	1914.930	0.25	1922.697	0.171	6.664156	0.188748	6.608	0.003
12	30	SGLVPRGSHNGSIYGD	17	1914.930	0.5	1922.780	0.100	6.747304	0.128385	6.624	0.003
12	30	SGLVPRGSHNGSIYGD	17	1914.930	1	1923.087	0.161	7.053969	0.180018	6.637	0.008
12	30	SGLVPRGSHNGSIYGD	17	1914.930	2	1923.107	0.057	7.074154	0.098966	6.664	0.007
12	30	SGLVPRGSHNGSIYGD	17	1914.930	5	1923.276	0.166	7.243721	0.184243	6.658	0.015
13	18	GLVPRG	4	598.367	0	598.788	0.042	0	0	5.25	0.01
13	18	GLVPRG	4	598.367	0.25	601.004	0.030	2.215992	0.051139	5.242	0.003
13	18	GLVPRG	4	598.367	0.5	600.939	0.089	2.151028	0.098403	5.25	0.005
13	18	GLVPRG	4	598.367	1	600.973	0.027	2.184981	0.04987	5.253	0.003
13	18	GLVPRG	4	598.367	2	600.848	0.076	2.059863	0.086741	5.255	0.005
13	18	GLVPRG	4	598.367	5	600.863	0.027	2.074952	0.049727	5.256	0.006
13	28	GLVPRGSHNGSIYGD	14	1641.834	0	1642.919	0.072	0	0	6.856	0.008
13	28	GLVPRGSHNGSIYGD	14	1641.834	0.5	1648.129	0.044	5.209919	0.083819	6.887	0.009
13	28	GLVPRGSHNGSIYGD	14	1641.834	1	1648.392	0.085	5.472799	0.111187	6.907	0.007
13	28	GLVPRGSHNGSIYGD	14	1641.834	2	1647.781	0.029	4.861285	0.077173	6.921	5E-04
13	28	GLVPRGSHNGSIYGD	14	1641.834	5	1648.373	0.014	5.453715	0.072837	6.933	0.003
13	30	GLVPRGSHNGSIYGD	16	1827.898	0	1828.864	0.051	0	0	6.632	0.005
13	30	GLVPRGSHNGSIYGD	16	1827.898	0.25	1834.919	0.070	6.054692	0.086338	6.63	0.004
13	30	GLVPRGSHNGSIYGD	16	1827.898	1	1835.478	0.126	6.613313	0.13604	6.682	0.017
13	30	GLVPRGSHNGSIYGD	16	1827.898	5	1835.482	0.046	6.617867	0.068559	6.69	0.013
14	18	LVPRG	3	541.346	0	541.592	0.008	0	0	4.27	0.01
14	18	LVPRG	3	541.346	0.25	543.134	0.008	1.541795	0.01082	4.265	0.006
14	18	LVPRG	3	541.346	0.5	543.107	0.054	1.514271	0.054203	4.274	0.007
14	18	LVPRG	3	541.346	1	543.116	0.032	1.523252	0.032585	4.273	0.007
14	18	LVPRG	3	541.346	2	543.020	0.048	1.427855	0.048481	4.282	0.004
14	18	LVPRG	3	541.346	5	543.079	0.020	1.486572	0.021347	4.271	0.004
14	28	LVPRGSHNGSIYGD	13	1584.813	0	1586.114	0.189	0	0	6.572	0.009
14	28	LVPRGSHNGSIYGD	13	1584.813	0.25	1589.928	0.066	3.813803	0.199901	6.568	0.002
14	28	LVPRGSHNGSIYGD	13	1584.813	0.5	1590.407	0.071	4.292762	0.20163	6.581	0.002
14	28	LVPRGSHNGSIYGD	13	1584.813	1	1590.586	0.049	4.471981	0.194828	6.598	0.01
14	28	LVPRGSHNGSIYGD	13	1584.813	2	1590.472	0.199	4.358258	0.274129	6.603	0.007
14	28	LVPRGSHNGSIYGD	13	1584.813	5	1590.554	0.084	4.440012	0.206392	6.608	0.008
14	30	LVPRGSHNGSIYGD	15	1770.877	0	1771.853	0.037	0	0	6.332	0.004
14	30	LVPRGSHNGSIYGD	15	1770.877	0.5	1777.523	0.130	5.669854	0.134666	6.343	0.003
14	30	LVPRGSHNGSIYGD	15	1770.877	1	1777.667	0.122	5.814483	0.127369	6.357	0.006
14	30	LVPRGSHNGSIYGD	15	1770.877	2	1777.584	0.294	5.730862	0.296596	6.364	0.007
14	30	LVPRGSHNGSIYGD	15	1770.877	5	1777.578	0.045	5.724706	0.058191	6.373	0.003
16	28	PRGSHNGSIYGD	11	1372.660	0	1373.413	0.047	0	0	6.571	0.006
16	28	PRGSHNGSIYGD	11	1372.660	0.25	1377.268	0.055	3.854478	0.072997	6.564	0.001
16	28	PRGSHNGSIYGD	11	1372.660	0.5	1377.489	0.101	4.075354	0.111226	6.577	0.002
16	28	PRGSHNGSIYGD	11	1372.660	1	1377.637	0.049	4.223648	0.068065	6.593	0.006
16	28	PRGSHNGSIYGD	11	1372.660	2	1377.605	0.073	4.191168	0.086671	6.6	0.007
16	28	PRGSHNGSIYGD	11	1372.660	5	1377.646	0.125	4.232782	0.133496	6.603	0.005
18	28	GSHNGSIYGD	10	1119.507	0	1120.164	0.082	0	0	6.979	0.008
18	28	GSHNGSIYGD	10	1119.507	0.25	1123.352	0.013	3.188009	0.082799	6.977	0.002
18	28	GSHNGSIYGD	10	1119.507	0.5	1123.498	0.026	3.333566	0.085714	6.986	0.005
18	28	GSHNGSIYGD	10	1119.507	1	1123.570	0.028	3.405878	0.086495	6.993	0.003
18	28	GSHNGSIYGD	10	1119.507	2	1123.472	0.078	3.307682	0.113258	6.994	0.004
18	28	GSHNGSIYGD	10	1119.507	5	1123.551	0.018	3.387316	0.083555	6.993	0.006
19	25	SHNGSIY	6	777.353	0	777.746	0.031	0	0	5.314	0.009
19	25	SHNGSIY	6	777.353	0.25	780.116	0.100	2.369702	0.104342	5.302	0.002
19	25	SHNGSIY	6	777.353	0.5	780.031	0.117	2.284841	0.120957	5.312	0.006
19	25	SHNGSIY	6	777.353	1	780.061	0.089	2.314654	0.094483	5.326	0.008
19	25	SHNGSIY	6	777.353	2	779.913	0.133	2.167263	0.136722	5.33	0.011
19	25	SHNGSIY	6	777.353	5	779.988	0.079	2.242073	0.085233	5.334	0.009
19	28	SHNGSIYGD	9	1062.485	0	1063.234	0.147	0	0	6.996	0.008
19	28	SHNGSIYGD	9	1062.485	0.25	1066.547	0.024	3.313471	0.149034	6.993	0.003
19	28	SHNGSIYGD	9	1062.485	0.5	1066.633	0.028	3.399198	0.149679	7.002	0.005
19	28	SHNGSIYGD	9	1062.485	1	1066.676	0.061	3.442027	0.159121	7.008	0.004
19	28	SHNGSIYGD	9	1062.485	2	1066.467	0.077	3.232927	0.165895	7.012	0.005
19	28	SHNGSIYGD	9	1062.485	5	1066.532	0.019	3.298591	0.148372	7.012	0.006
19	30	SHNGSIYGD	11	1248.549	0	1249.064	0.087	0	0	6.673	0.009
19	30	SHNGSIYGD	11	1248.549	0.25	1253.625	0.082	4.560822	0.119658	6.667	0.001

Start	Ende	Sequenz	MaxUptake	MHP	Exposure	Center	Center SD	Uptake	Uptake SD	RT	RT SD
19	30	SHNGSIYGDLDLAD	11	1248.549	0.5	1253.673	0.045	4.608638	0.098441	6.678	0.008
19	30	SHNGSIYGDLDLAD	11	1248.549	1	1253.557	0.117	4.492606	0.145648	6.691	0.005
19	30	SHNGSIYGDLDLAD	11	1248.549	2	1253.500	0.163	4.435644	0.185333	6.691	0.009
19	30	SHNGSIYGDLDLAD	11	1248.549	5	1253.374	0.098	4.310313	0.131105	6.689	0.011
20	25	HNGSIY	5	690.321	0	690.606	0.027	0	0	5.279	0.011
20	25	HNGSIY	5	690.321	0.25	692.669	0.021	2.063468	0.034102	5.275	0.003
20	25	HNGSIY	5	690.321	0.5	692.653	0.077	2.046855	0.081916	5.284	0.003
20	25	HNGSIY	5	690.321	1	692.681	0.023	2.07487	0.035289	5.291	0.005
20	25	HNGSIY	5	690.321	2	692.572	0.074	1.966309	0.078902	5.295	0.005
20	25	HNGSIY	5	690.321	5	692.626	0.030	2.020138	0.040121	5.297	0.005
22	25	GSİY	3	439.219	0	439.434	0.005	0	0	6.105	0.006
22	25	GSİY	3	439.219	0.25	441.032	0.008	1.597512	0.008893	6.102	4E-04
22	25	GSİY	3	439.219	0.5	440.989	0.053	1.554181	0.0529	6.11	0.006
22	25	GSİY	3	439.219	1	441.015	0.013	1.580516	0.014052	6.114	0.002
22	25	GSİY	3	439.219	2	440.920	0.067	1.485905	0.066792	6.115	0.005
22	25	GSİY	3	439.219	5	440.942	0.016	1.507595	0.016201	6.109	0.004
22	28	GSİYGDL	6	724.351	0	724.850	0.014	0	0	7.785	0.002
22	28	GSİYGDL	6	724.351	0.25	727.987	0.024	3.137472	0.028157	7.779	0.003
22	28	GSİYGDL	6	724.351	0.5	727.972	0.038	3.122406	0.040621	7.783	0.004
22	28	GSİYGDL	6	724.351	1	727.971	0.003	3.121709	0.01487	7.788	0.004
22	28	GSİYGDL	6	724.351	2	727.832	0.019	2.981754	0.023778	7.786	0.005
22	28	GSİYGDL	6	724.351	5	727.840	0.021	2.990705	0.025662	7.787	0.005
22	30	GSİYGDLAD	8	910.415	0	910.869	0.029	0	0	7.34	0.005
22	30	GSİYGDLAD	8	910.415	0.25	915.249	0.011	4.379803	0.030905	7.336	0.002
22	30	GSİYGDLAD	8	910.415	0.5	915.268	0.012	4.399574	0.031534	7.346	0.009
22	30	GSİYGDLAD	8	910.415	1	915.261	0.029	4.392748	0.04126	7.348	6E-04
22	30	GSİYGDLAD	8	910.415	2	915.082	0.037	4.213367	0.047146	7.342	0.009
22	30	GSİYGDLAD	8	910.415	5	915.030	0.044	4.161549	0.052684	7.345	0.009
23	28	SIYGD	5	667.330	0	667.661	0.004	0	0	7.783	0.003
23	28	SIYGD	5	667.330	0.25	670.261	0.104	2.599585	0.104176	7.78	0.004
23	28	SIYGD	5	667.330	0.5	670.288	0.037	2.626626	0.037621	7.784	0.004
23	28	SIYGD	5	667.330	1	670.291	0.017	2.62957	0.017639	7.789	0.005
23	28	SIYGD	5	667.330	2	670.174	0.001	2.513071	0.004068	7.788	0.005
23	28	SIYGD	5	667.330	5	670.158	0.024	2.496511	0.024405	7.789	0.005
26	31	GDLADF	5	637.283	0	637.560	0.028	0	0	7.794	0.002
26	31	GDLADF	5	637.283	0.25	639.967	0.021	2.406882	0.035315	7.794	0.003
26	31	GDLADF	5	637.283	0.5	639.954	0.031	2.393926	0.041937	7.798	0.004
26	31	GDLADF	5	637.283	1	639.945	0.016	2.384828	0.032491	7.803	0.004
26	31	GDLADF	5	637.283	2	639.828	0.015	2.267465	0.03198	7.801	0.005
26	31	GDLADF	5	637.283	5	639.840	0.026	2.280032	0.03835	7.803	0.006
29	36	ADFSGPYE	6	885.363	0	885.849	0.025	0	0	6.9	0.004
29	36	ADFSGPYE	6	885.363	0.25	888.100	0.055	2.250629	0.060469	6.906	0.005
29	36	ADFSGPYE	6	885.363	0.5	888.099	0.032	2.249255	0.040512	6.912	0.007
29	36	ADFSGPYE	6	885.363	1	887.978	0.077	2.128315	0.081082	6.915	0.003
29	36	ADFSGPYE	6	885.363	2	887.945	0.051	2.095726	0.056312	6.918	0.002
29	36	ADFSGPYE	6	885.363	5	887.950	0.040	2.10074	0.046916	6.913	0.005
31	36	FSGPYE	4	699.298	0	699.664	0.011	0	0	6.486	0.004
31	36	FSGPYE	4	699.298	0.25	701.220	0.017	1.556031	0.020279	6.494	1E-03
31	36	FSGPYE	4	699.298	0.5	701.234	0.030	1.569969	0.032185	6.502	0.005
31	36	FSGPYE	4	699.298	1	701.144	0.035	1.479937	0.036214	6.507	0.003
31	36	FSGPYE	4	699.298	2	701.122	0.022	1.458331	0.024329	6.505	0.004
31	36	FSGPYE	4	699.298	5	701.101	0.029	1.43724	0.030704	6.501	0.005
31	38	FSGPYEKF	6	974.462	0	975.067	0.034	0	0	6.994	0.007
31	38	FSGPYEKF	6	974.462	0.25	975.740	0.017	0.672837	0.038277	7.006	0.003
31	38	FSGPYEKF	6	974.462	0.5	975.822	0.063	0.75529	0.072029	7.013	0.005
31	38	FSGPYEKF	6	974.462	1	975.714	0.093	0.647273	0.099171	7.019	0.004
31	38	FSGPYEKF	6	974.462	2	975.559	0.128	0.491969	0.132687	7.02	0.005
31	38	FSGPYEKF	6	974.462	5	975.728	0.036	0.660429	0.049728	7.021	0.006
32	38	SGPYEKF	5	827.393	0	827.954	0.084	0	0	6.251	0.035
32	38	SGPYEKF	5	827.393	0.25	828.155	0.086	0.20177	0.120491	6.272	0.005
32	38	SGPYEKF	5	827.393	0.5	828.224	0.081	0.270574	0.116892	6.279	0.005
32	38	SGPYEKF	5	827.393	1	828.238	0.084	0.284702	0.119266	6.284	0.003
32	38	SGPYEKF	5	827.393	2	828.209	0.094	0.255155	0.126122	6.287	0.006
32	38	SGPYEKF	5	827.393	5	828.272	0.102	0.318727	0.13219	6.285	0.005
37	48	KFEDGTIPCGQF	10	1341.614	0	1342.658	0.341	0	0	7.557	0.146
37	48	KFEDGTIPCGQF	10	1341.614	0.25	1342.872	0.345	0.21409	0.484722	7.641	0.19
37	48	KFEDGTIPCGQF	10	1341.614	0.5	1342.454	0.102	-0.20386	0.35562	7.433	0.005
37	48	KFEDGTIPCGQF	10	1341.614	1	1342.745	0.202	0.087476	0.395905	7.438	0.004
37	48	KFEDGTIPCGQF	10	1341.614	2	1342.430	0.089	-0.22732	0.352086	7.438	0.006
37	48	KFEDGTIPCGQF	10	1341.614	5	1342.559	0.018	-0.09884	0.341121	7.439	0.005
47	53	QFPSSGQG	5	720.331	0	720.655	0.017	0	0	5.729	0.371
47	53	QFPSSGQG	5	720.331	0.25	723.068	0.077	2.413057	0.078962	6.094	0.002
47	53	QFPSSGQG	5	720.331	0.5	723.105	0.154	2.45021	0.155232	6.093	0.004
47	53	QFPSSGQG	5	720.331	1	723.173	0.032	2.518166	0.035973	6.095	0.002
47	53	QFPSSGQG	5	720.331	2	722.934	0.081	2.27887	0.082741	6.097	0.004
47	53	QFPSSGQG	5	720.331	5	723.043	0.017	2.388369	0.024047	6.096	0.004
49	59	PSGQGVIPISW	8	1140.605	0	1141.215	0.039	0	0	8.615	0.005
49	59	PSGQGVIPISW	8	1140.605	0.25	1141.641	0.188	0.425357	0.192122	8.619	0.001
49	59	PSGQGVIPISW	8	1140.605	0.5	1141.826	0.110	0.610313	0.116872	8.618	0.002
49	59	PSGQGVIPISW	8	1140.605	1	1141.921	0.037	0.706001	0.053885	8.626	0.004
49	59	PSGQGVIPISW	8	1140.605	2	1141.813	0.064	0.597962	0.0748	8.623	0.005
49	59	PSGQGVIPISW	8	1140.605	5	1141.836	0.034	0.620285	0.051671	8.622	0.004
49	60	PSGQGVIPISWL	9	1253.689	0	1254.384	0.068	0	0	9.386	0.006
49	60	PSGQGVIPISWL	9	1253.689	0.25	1254.774	0.261	0.390459	0.269466	9.398	0.002
49	60	PSGQGVIPISWL	9	1253.689	0.5	1255.089	0.180	0.705094	0.192193	9.399	0.004
49	60	PSGQGVIPISWL	9	1253.689	1	1255.267	0.040	0.883385	0.078286	9.401	0.002
49	60	PSGQGVIPISWL	9	1253.689	2	1255.187	0.145	0.803351	0.159827	9.4	0.005
49	60	PSGQGVIPISWL	9	1253.689	5	1255.168	0.031	0.784788	0.074414	9.401	0.004
53	59	GVIPISW	5	771.440	0	771.861	0.010	0	0	8.844	0.006
53	59	GVIPISW	5	771.440	0.25	772.439	0.156	0.578909	0.156788	8.851	0.001
53	59	GVIPISW	5	771.440	0.5	772.769	0.112	0.908946	0.112184	8.851	0.005
53	59	GVIPISW	5	771.440	1	772.744	0.046	0.88368	0.047498	8.858	0.003
53	59	GVIPISW	5	771.440	2	772.573	0.100	0.712274	0.100605	8.855	0.004
53	59	GVIPISW	5	771.440	5	772.667	0.018	0.806045	0.020262	8.855	0.005
53	60	GVIPISWL	6	884.524	0	884.944	0.058	0	0	9.641	0.005
53	60	GVIPISWL	6	884.524	0.25	885.554	0.306	0.609283	0.311165	9.652	0.002
53	60	GVIPISWL	6	884.524	0.5	885.907	0.205	0.962236	0.212918	9.654	0.003
53	60	GVIPISWL	6	884.524	1	886.060	0.162	1.115719	0.172016	9.656	0.003

Start	Ende	Sequenz	MaxUptake	MHP	Exposure	Center	Center SD	Uptake	Uptake SD	RT	RT SD
53	60	GVIPISWL	6	884.524	2	885.925	0.116	0.98085	0.129468	9.655	0.005
53	60	GVIPISWL	6	884.524	5	885.966	0.078	1.021393	0.097178	9.655	0.004
54	58	VIPIIS	3	528.339	0	528.662	0.015	0	0	5.993	0.004
54	58	VIPIIS	3	528.339	0.25	530.253	0.019	1.591814	0.024086	5.986	0.011
54	58	VIPIIS	3	528.339	0.5	530.211	0.047	1.549385	0.049161	5.986	0.008
54	58	VIPIIS	3	528.339	1	530.242	0.006	1.580502	0.015745	5.994	0.01
54	58	VIPIIS	3	528.339	2	530.154	0.029	1.492073	0.032915	5.988	0.008
54	58	VIPIIS	3	528.339	5	530.184	0.017	1.522246	0.022384	5.986	0.01
54	59	VIPISW	4	714.419	0	714.824	0.022	0	0	8.588	0.009
54	59	VIPISW	4	714.419	0.25	717.094	0.003	2.26947	0.022164	8.586	3E-04
54	59	VIPISW	4	714.419	0.5	717.076	0.047	2.251356	0.051703	8.588	0.004
54	59	VIPISW	4	714.419	1	717.101	0.067	2.27651	0.070413	8.592	0.002
54	59	VIPISW	4	714.419	2	716.979	0.019	2.154345	0.028854	8.589	0.005
54	59	VIPISW	4	714.419	5	717.008	0.102	2.183585	0.104595	8.587	0.005
54	60	VIPISWL	5	827.503	0	827.961	0.023	0	0	9.473	0.006
54	60	VIPISWL	5	827.503	0.25	830.994	0.241	3.033544	0.242456	9.471	8E-04
54	60	VIPISWL	5	827.503	0.5	831.014	0.230	3.053733	0.231299	9.471	0.004
54	60	VIPISWL	5	827.503	1	830.991	0.261	3.029827	0.262305	9.477	0.004
54	60	VIPISWL	5	827.503	2	830.843	0.222	2.882626	0.223178	9.476	0.007
54	60	VIPISWL	5	827.503	5	830.852	0.225	2.89119	0.225779	9.473	0.005
60	65	LDEGGW	5	676.294	0	676.619	0.032	0	0	7.596	0.004
60	65	LDEGGW	5	676.294	0.25	677.824	0.287	1.205666	0.289142	7.604	0.001
60	65	LDEGGW	5	676.294	0.5	677.917	0.035	1.298346	0.047437	7.608	0.005
60	65	LDEGGW	5	676.294	1	677.869	0.015	1.250902	0.035841	7.612	0.002
60	65	LDEGGW	5	676.294	2	677.777	0.164	1.158529	0.167236	7.611	0.006
60	65	LDEGGW	5	676.294	5	677.821	0.021	1.202209	0.03839	7.609	0.006
60	67	LDEGGWSG	7	820.347	0	820.739	0.036	0	0	6.865	0.003
60	67	LDEGGWSG	7	820.347	0.25	822.487	0.155	1.74874	0.159178	6.876	0.001
60	67	LDEGGWSG	7	820.347	0.5	822.431	0.160	1.692638	0.163893	6.874	0.002
60	67	LDEGGWSG	7	820.347	1	822.479	0.201	1.740679	0.203709	6.88	0.003
60	67	LDEGGWSG	7	820.347	2	822.410	0.345	1.67089	0.347029	6.881	0.003
60	67	LDEGGWSG	7	820.347	5	822.608	0.215	1.869713	0.217903	6.878	0.006
60	69	LDEGGWSGVE	9	1048.458	0	1048.939	0.065	0	0	7.386	0.002
60	69	LDEGGWSGVE	9	1048.458	0.25	1051.611	0.359	2.672215	0.364377	7.396	0.003
60	69	LDEGGWSGVE	9	1048.458	0.5	1051.714	0.366	2.775277	0.371505	7.4	0.006
60	69	LDEGGWSGVE	9	1048.458	1	1051.668	0.319	2.729384	0.325967	7.404	0.002
60	69	LDEGGWSGVE	9	1048.458	2	1051.489	0.514	2.550487	0.517815	7.401	0.005
60	69	LDEGGWSGVE	9	1048.458	5	1051.726	0.315	2.787771	0.321921	7.397	0.006
60	71	LDEGGWSGVENT	11	1263.549	0	1264.366	0.114	0	0	7.144	0.003
60	71	LDEGGWSGVENT	11	1263.549	0.25	1267.898	0.193	3.531577	0.224474	7.15	0.002
60	71	LDEGGWSGVENT	11	1263.549	0.5	1267.947	0.269	3.580849	0.29246	7.153	0.006
60	71	LDEGGWSGVENT	11	1263.549	1	1267.852	0.221	3.485683	0.248686	7.159	0.002
60	71	LDEGGWSGVENT	11	1263.549	2	1267.849	0.280	3.482872	0.302349	7.155	0.006
60	71	LDEGGWSGVENT	11	1263.549	5	1267.857	0.243	3.490885	0.268873	7.152	0.007
60	72	LDEGGWSGVENTD	12	1378.576	0	1379.257	0.025	0	0	7.125	0.001
60	72	LDEGGWSGVENTD	12	1378.576	0.25	1383.550	0.327	4.293235	0.032515	7.135	0.001
60	72	LDEGGWSGVENTD	12	1378.576	0.5	1383.617	0.225	4.160528	0.022643	7.146	0.001
60	72	LDEGGWSGVENTD	12	1378.576	1	1383.349	0.225	4.192619	0.022686	7.143	0.003
60	72	LDEGGWSGVENTD	12	1378.576	2	1383.414	0.156	4.157302	0.015775	7.141	0.007
60	72	LDEGGWSGVENTD	12	1378.576	5	1383.215	0.198	3.958562	0.019909	7.136	0.007
60	73	LDEGGWSGVENTDT	13	1479.623	0	1480.349	0.060	0	0	7.114	0.002
60	73	LDEGGWSGVENTDT	13	1479.623	0.25	1484.445	0.291	4.09649	0.297426	7.12	4E-04
60	73	LDEGGWSGVENTDT	13	1479.623	1	1484.281	0.335	3.932247	0.34065	7.131	0.002
60	73	LDEGGWSGVENTDT	13	1479.623	2	1484.874	0.324	4.525769	0.329476	7.122	0.007
60	73	LDEGGWSGVENTDT	13	1479.623	5	1484.441	0.310	4.092576	0.315893	7.119	0.008
61	67	DEGGWSG	6	707.263	0	707.571	0.018	0	0	6.429	0.003
61	67	DEGGWSG	6	707.263	0.25	709.079	0.060	1.508096	0.062416	6.443	0.001
61	67	DEGGWSG	6	707.263	0.5	709.097	0.027	1.526673	0.032331	6.448	0.004
61	67	DEGGWSG	6	707.263	1	709.075	0.030	1.504042	0.035304	6.452	0.002
61	67	DEGGWSG	6	707.263	2	708.992	0.275	1.421596	0.27569	6.453	0.004
61	67	DEGGWSG	6	707.263	5	709.172	0.016	1.60154	0.024283	6.451	0.004
61	69	DEGGWSGVE	8	935.374	0	935.835	0.020	0	0	7.139	0.006
61	69	DEGGWSGVE	8	935.374	0.25	938.311	0.613	2.475796	0.613206	7.151	0.004
61	69	DEGGWSGVE	8	935.374	0.5	938.579	0.039	2.744086	0.043969	7.155	0.005
61	69	DEGGWSGVE	8	935.374	1	938.492	0.073	2.657	0.075589	7.158	0.003
61	69	DEGGWSGVE	8	935.374	2	938.359	0.421	2.52438	0.420984	7.158	0.004
61	69	DEGGWSGVE	8	935.374	5	938.600	0.027	2.765372	0.033702	7.154	0.005
61	71	DEGGWSGVENT	10	1150.465	0	1151.155	0.082	0	0	6.892	0.005
61	71	DEGGWSGVENT	10	1150.465	0.25	1154.457	0.292	3.302239	0.303387	6.9	0.002
61	71	DEGGWSGVENT	10	1150.465	0.5	1154.504	0.274	3.348553	0.286105	6.903	0.005
61	71	DEGGWSGVENT	10	1150.465	1	1154.389	0.255	3.23375	0.267768	6.908	0.003
61	71	DEGGWSGVENT	10	1150.465	2	1154.444	0.279	3.288705	0.290509	6.908	0.004
61	71	DEGGWSGVENT	10	1150.465	5	1154.462	0.236	3.306687	0.249439	6.902	0.006
72	84	DTSTGGSCKEGSY	12	1291.511	0	1292.279	0.079	0	0	4.974	0.004
72	84	DTSTGGSCKEGSY	12	1291.511	0.25	1295.045	0.039	2.76564	0.088139	4.983	0.002
72	84	DTSTGGSCKEGSY	12	1291.511	0.5	1295.076	0.178	2.797142	0.194439	4.985	0.006
72	84	DTSTGGSCKEGSY	12	1291.511	1	1295.012	0.142	2.732917	0.162313	4.99	0.005
72	84	DTSTGGSCKEGSY	12	1291.511	2	1295.008	0.020	2.729389	0.081395	4.989	0.006
72	84	DTSTGGSCKEGSY	12	1291.511	5	1295.018	0.148	2.738835	0.167798	4.987	0.005
94	106	KTQWPSDQPSDG	10	1432.634	0	1433.437	0.106	0	0	5.656	0.073
94	106	KTQWPSDQPSDG	10	1432.634	0.25	1433.866	0.063	0.429789	0.012196	5.69	0.093
94	106	KTQWPSDQPSDG	10	1432.634	0.5	1433.902	0.025	0.46536	0.010843	5.687	0.086
94	106	KTQWPSDQPSDG	10	1432.634	1	1433.912	0.041	0.475527	0.011368	5.657	0.003
94	106	KTQWPSDQPSDG	10	1432.634	2	1433.874	0.089	0.437145	0.013824	5.753	0.119
94	106	KTQWPSDQPSDG	10	1432.634	5	1433.877	0.035	0.440073	0.011371	5.753	0.116
94	108	SKTQWPSDQPSDGRS	12	1675.767	0	1676.660	0.070	0	0	5.227	0.007
94	108	SKTQWPSDQPSDGRS	12	1675.767	0.25	1677.116	0.081	0.455363	0.106812	5.248	####
94	108	SKTQWPSDQPSDGRS	12	1675.767	0.5	1677.284	0.092	0.623293	0.116033	5.243	0.005
94	108	SKTQWPSDQPSDGRS	12	1675.767	1	1677.310	0.107	0.649765	0.128234	5.257	0.007
94	108	SKTQWPSDQPSDGRS	12	1675.767	2	1677.257	0.105	0.596506	0.126506	5.259	0.008
94	108	SKTQWPSDQPSDGRS	12	1675.767	5	1677.313	0.048	0.652214	0.085082	5.26	0.009
94	112	SKTQWPSDQPSDGRSIGGL	16	2015.978	0	2017.180	0.063	0	0	6.578	0.006
94	112	SKTQWPSDQPSDGRSIGGL	16	2015.978	0.25	2017.803	0.103	0.622423	0.120274	6.585	0.007
94	112	SKTQWPSDQPSDGRSIGGL	16	2015.978	0.5	2018.076	0.104	0.895837	0.121484	6.589	0.005
94	112	SKTQWPSDQPSDGRSIGGL	16	2015.978	1	2018.201	0.060	1.021	0.086458	6.595	0.004
94	112	SKTQWPSDQPSDGRSIGGL	16	2015.978	2	2018.183	0.062	1.002922	0.088058	6.597	0.002
94	112	SKTQWPSDQPSDGRSIGGL	16	2015.978	5	2018.103	0.131	0.922772	0.144977	6.602	0.006

Start	Ende	Sequenz	MaxUptake	MHP	Exposure	Center	Center SD	Uptake	Uptake SD	RT	RT SD
95	106	KTQWPSDQPSDG	9	1345.602	0	1346.351	0.046	0	0	5.647	0.006
95	106	KTQWPSDQPSDG	9	1345.602	0.25	1346.707	0.043	0.355948	0.062817	5.658	0.002
95	106	KTQWPSDQPSDG	9	1345.602	0.5	1346.875	0.022	0.524496	0.050662	5.658	8E-04
95	106	KTQWPSDQPSDG	9	1345.602	1	1346.896	0.029	0.545086	0.053953	5.668	0.002
95	106	KTQWPSDQPSDG	9	1345.602	2	1346.713	0.032	0.361716	0.05588	5.669	0.003
95	106	KTQWPSDQPSDG	9	1345.602	5	1346.883	0.021	0.531798	0.05041	5.667	0.004
95	108	KTQWPSDQPSDGRS	11	1588.735	0	1589.540	0.073	0	0	5.231	0.007
95	108	KTQWPSDQPSDGRS	11	1588.735	0.25	1590.056	0.090	0.516016	0.115834	5.25	0.006
95	108	KTQWPSDQPSDGRS	11	1588.735	0.5	1590.125	0.071	0.585801	0.101799	5.251	0.007
95	108	KTQWPSDQPSDGRS	11	1588.735	1	1590.157	0.037	0.617216	0.081562	5.268	0.009
95	108	KTQWPSDQPSDGRS	11	1588.735	2	1590.090	0.098	0.550156	0.12221	5.273	0.009
95	108	KTQWPSDQPSDGRS	11	1588.735	5	1590.099	0.008	0.559885	0.072986	5.268	0.009
95	112	KTQWPSDQPSDGRSIGGL	15	1928.946	0	1930.097	0.097	0	0	6.578	0.062
95	112	KTQWPSDQPSDGRSIGGL	15	1928.946	0.25	1930.460	0.148	0.363233	0.177039	6.598	0.013
95	112	KTQWPSDQPSDGRSIGGL	15	1928.946	0.5	1930.563	0.119	0.466267	0.153621	6.6	0.007
95	112	KTQWPSDQPSDGRSIGGL	15	1928.946	1	1930.667	0.022	0.569648	0.099008	6.611	0.003
95	112	KTQWPSDQPSDGRSIGGL	15	1928.946	2	1930.525	0.131	0.428245	0.162494	6.62	0.006
95	112	KTQWPSDQPSDGRSIGGL	15	1928.946	5	1930.663	0.012	0.565934	0.097349	6.62	0.005
95	113	KTQWPSDQPSDGRSIGGLL	16	2042.030	0	2043.095	0.013	0	0	7.282	0.004
95	113	KTQWPSDQPSDGRSIGGLL	16	2042.030	0.25	2043.618	0.035	0.523007	0.037104	7.3	0.001
95	113	KTQWPSDQPSDGRSIGGLL	16	2042.030	0.5	2044.168	0.138	1.07255	0.138338	7.305	0.003
95	113	KTQWPSDQPSDGRSIGGLL	16	2042.030	1	2044.044	0.068	0.949136	0.068986	7.345	0.014
95	113	KTQWPSDQPSDGRSIGGLL	16	2042.030	2	2043.752	0.057	0.657094	0.05829	7.341	0.004
95	113	KTQWPSDQPSDGRSIGGLL	16	2042.030	5	2044.143	0.077	1.047215	0.077904	7.399	0.056
96	111	TQWPSDQPSDGRSIGG	13	1687.767	0	1688.611	0.011	0	0	6.122	0.007
96	111	TQWPSDQPSDGRSIGG	13	1687.767	0.25	1695.126	0.101	6.514881	0.101812	6.133	0.006
96	111	TQWPSDQPSDGRSIGG	13	1687.767	0.5	1695.015	0.169	6.403028	0.168936	6.137	0.005
96	111	TQWPSDQPSDGRSIGG	13	1687.767	1	1695.072	0.067	6.460797	0.067603	6.143	0.005
96	111	TQWPSDQPSDGRSIGG	13	1687.767	2	1694.718	0.220	6.106559	0.220669	6.138	0.004
96	111	TQWPSDQPSDGRSIGG	13	1687.767	5	1694.945	0.053	6.333656	0.054268	6.139	0.006
97	111	QWPSDQPSDGRSIGG	12	1586.719	0	1587.498	0.024	0	0	6.141	0.003
97	111	QWPSDQPSDGRSIGG	12	1586.719	0.25	1593.406	0.082	5.908078	0.08538	6.15	0.006
97	111	QWPSDQPSDGRSIGG	12	1586.719	0.5	1593.159	0.172	5.661826	0.17321	6.153	0.005
97	111	QWPSDQPSDGRSIGG	12	1586.719	1	1593.297	0.008	5.799619	0.025047	6.154	0.004
97	111	QWPSDQPSDGRSIGG	12	1586.719	2	1593.000	0.181	5.502246	0.182631	6.155	0.004
97	111	QWPSDQPSDGRSIGG	12	1586.719	5	1593.113	0.050	5.615204	0.055729	6.156	0.007
113	119	LCKDGYL	6	811.402	0	811.940	0.079	0	0	6.497	0.007
113	119	LCKDGYL	6	811.402	0.25	812.128	0.081	0.187518	0.112946	6.513	0.003
113	119	LCKDGYL	6	811.402	0.5	812.137	0.058	0.196589	0.097709	6.517	0.004
113	119	LCKDGYL	6	811.402	1	812.173	0.061	0.233042	0.099332	6.525	0.002
113	119	LCKDGYL	6	811.402	2	812.090	0.098	0.149731	0.125695	6.53	0.003
113	119	LCKDGYL	6	811.402	5	812.149	0.044	0.208707	0.090086	6.521	9E-04
120	128	YRSNTDTDY	8	1134.470	0	1135.257	0.147	0	0	5.155	0.007
120	128	YRSNTDTDY	8	1134.470	0.25	1136.249	0.083	0.992021	0.169091	5.168	0.004
120	128	YRSNTDTDY	8	1134.470	0.5	1136.340	0.082	1.083454	0.168437	5.175	0.003
120	128	YRSNTDTDY	8	1134.470	1	1136.253	0.109	0.996077	0.18285	5.189	0.006
120	128	YRSNTDTDY	8	1134.470	2	1136.272	0.074	1.015295	0.164756	5.192	0.008
120	128	YRSNTDTDY	8	1134.470	5	1136.260	0.108	1.003047	0.182473	5.2	0.008
132	135	WGVD	3	476.214	0	476.569	0.042	0	0	7.035	0.005
132	135	WGVD	3	476.214	0.25	477.177	0.037	0.607877	0.056165	7.04	0.001
132	135	WGVD	3	476.214	0.5	477.200	0.027	0.631379	0.049648	7.045	0.006
132	135	WGVD	3	476.214	1	477.204	0.026	0.634863	0.049588	7.051	0.003
132	135	WGVD	3	476.214	2	477.172	0.005	0.603091	0.042201	7.051	0.004
132	135	WGVD	3	476.214	5	477.119	0.025	0.549644	0.048796	7.046	0.006
132	137	WGVDA	5	618.288	0	618.734	0.046	0	0	7.06	0.006
132	137	WGVDA	5	618.288	0.25	619.922	0.057	1.188777	0.072776	7.058	5E-04
132	137	WGVDA	5	618.288	0.5	619.944	0.024	1.210141	0.051369	7.062	0.006
132	137	WGVDA	5	618.288	1	619.887	0.039	1.153485	0.059859	7.068	0.002
132	137	WGVDA	5	618.288	2	619.875	0.010	1.141335	0.046658	7.068	0.004
132	137	WGVDA	5	618.288	5	619.916	0.011	1.182709	0.046902	7.063	0.007
138	142	YVVSE	4	596.293	0	596.758	0.040	0	0	5.657	0.003
138	142	YVVSE	4	596.293	0.25	597.641	0.014	0.883642	0.042967	5.662	0.003
138	142	YVVSE	4	596.293	0.5	597.626	0.033	0.868569	0.052358	5.663	0.004
138	142	YVVSE	4	596.293	1	597.610	0.060	0.852237	0.072008	5.668	0.004
138	142	YVVSE	4	596.293	2	597.524	0.003	0.765922	0.040618	5.664	0.004
138	142	YVVSE	4	596.293	5	597.515	0.020	0.756893	0.045016	5.665	0.006
138	143	YVVSEL	5	709.377	0	709.926	0.068	0	0	7.448	0.006
138	143	YVVSEL	5	709.377	0.25	711.416	0.053	1.490303	0.085958	7.45	0.003
138	143	YVVSEL	5	709.377	0.5	711.421	0.020	1.494891	0.070882	7.453	0.005
138	143	YVVSEL	5	709.377	1	711.317	0.048	1.391141	0.08339	7.458	0.003
138	143	YVVSEL	5	709.377	2	711.241	0.015	1.315422	0.069568	7.456	0.004
138	143	YVVSEL	5	709.377	5	711.205	0.006	1.279559	0.068144	7.455	0.005
138	146	YVVSELSND	8	1025.479	0	1026.006	0.057	0	0	6.665	0.005
138	146	YVVSELSND	8	1025.479	0.25	1027.965	0.295	1.95902	0.300084	6.667	0.007
138	146	YVVSELSND	8	1025.479	0.5	1027.982	0.276	1.975919	0.281624	6.669	0.003
138	146	YVVSELSND	8	1025.479	1	1028.026	0.298	2.019721	0.303447	6.678	0.007
138	146	YVVSELSND	8	1025.479	2	1027.651	0.410	1.644931	0.414439	6.681	0.004
138	146	YVVSELSND	8	1025.479	5	1027.710	0.230	1.703748	0.236526	6.675	0.008
139	143	VVSEL	4	546.313	0	546.827	0.069	0	0	6.412	0.008
139	143	VVSEL	4	546.313	0.25	547.922	0.004	1.095056	0.069108	6.412	5E-04
139	143	VVSEL	4	546.313	0.5	547.912	0.014	1.08523	0.0705	6.418	0.005
139	143	VVSEL	4	546.313	1	547.893	0.024	1.065553	0.073138	6.422	0.002
139	143	VVSEL	4	546.313	2	547.822	0.011	0.994761	0.069926	6.422	0.004
139	143	VVSEL	4	546.313	5	547.824	0.008	0.997343	0.069484	6.419	0.005
139	146	VVSELSND	7	862.415	0	862.940	0.056	0	0	5.62	0.006
139	146	VVSELSND	7	862.415	0.25	865.015	0.275	2.074519	0.280948	5.624	0.001
139	146	VVSELSND	7	862.415	0.5	864.996	0.269	2.055615	0.274718	5.625	0.007
139	146	VVSELSND	7	862.415	1	864.934	0.290	1.994113	0.295012	5.628	0.002
139	146	VVSELSND	7	862.415	2	864.797	0.265	1.856682	0.271163	5.629	0.004
139	146	VVSELSND	7	862.415	5	864.795	0.225	1.854905	0.231606	5.627	0.005
147	159	VAICRTDYPGTEN	11	1438.663	0	1439.459	0.026	0	0	5.873	0.003
147	159	VAICRTDYPGTEN	11	1438.663	0.25	1440.146	0.348	0.686837	0.348476	5.884	0.005
147	159	VAICRTDYPGTEN	11	1438.663	0.5	1440.537	0.000	1.07752	0.025913	5.883	0
147	159	VAICRTDYPGTEN	11	1438.663	1	1440.610	0.000	1.150735	0.025913	5.895	0
147	159	VAICRTDYPGTEN	11	1438.663	2	1440.590	0.000	1.131122	0.025913	5.89	0
147	159	VAICRTDYPGTEN	11	1438.663	5	1440.723	0.083	1.263238	0.08681	5.881	0.005
147	160	VAICRTDYPGTENM	12	1569.704	0	1570.679	0.031	0	0	6.561	0.006

Start	Ende	Sequenz	MaxUptake	MHP	Exposure	Center	Center SD	Uptake	Uptake SD	RT	RT SD
147	160	VAICRTDYPGTENM	12	1569.704	0.25	1575.435	0.121	4.955722	0.012603	6.556	1E-04
147	160	VAICRTDYPGTENM	12	1569.704	0.5	1575.554	0.162	4.974859	0.016502	6.554	0.005
147	160	VAICRTDYPGTENM	12	1569.704	1	1576.012	0.650	4.833014	0.065188	6.56	0.004
147	160	VAICRTDYPGTENM	12	1569.704	2	1577.255	0.042	4.675578	0.051894	6.557	0.005
147	160	VAICRTDYPGTENM	12	1569.704	5	1575.206	0.070	4.527055	0.076067	6.56	0.007
151	160	RTDYPGTENM	8	1183.505	0	1184.165	0.050	0	0	5.878	0.004
151	160	RTDYPGTENM	8	1183.505	0.25	1187.938	0.039	3.772776	0.06392	5.878	0.003
151	160	RTDYPGTENM	8	1183.505	0.5	1187.820	0.145	3.655236	0.153261	5.884	0.004
151	160	RTDYPGTENM	8	1183.505	1	1187.873	0.047	3.708109	0.068843	5.89	0.005
151	160	RTDYPGTENM	8	1183.505	2	1187.627	0.140	3.462136	0.148985	5.889	0.005
151	160	RTDYPGTENM	8	1183.505	5	1187.702	0.043	3.537323	0.066162	5.888	0.005
152	160	TDYPGTENM	7	1027.404	0	1027.947	0.028	0	0	6.402	0.002
152	160	TDYPGTENM	7	1027.404	0.25	1031.475	0.265	3.528213	0.266394	6.407	0.003
152	160	TDYPGTENM	7	1027.404	0.5	1031.428	0.284	3.48092	0.285132	6.406	0.005
152	160	TDYPGTENM	7	1027.404	1	1031.474	0.249	3.527714	0.250566	6.411	0.006
152	160	TDYPGTENM	7	1027.404	2	1031.263	0.276	3.316675	0.277864	6.408	0.005
152	160	TDYPGTENM	7	1027.404	5	1031.304	0.285	3.357117	0.286733	6.41	0.007
152	170	TDYPGTENMVIPTYVQAGD	16	2070.933	0	2072.089	0.080	0	0	6.197	0.005
152	170	TDYPGTENMVIPTYVQAGD	16	2070.933	0.25	2072.853	0.239	0.764262	0.252526	6.207	0.001
152	170	TDYPGTENMVIPTYVQAGD	16	2070.933	0.5	2073.375	0.055	1.285671	0.097002	6.211	0.004
152	170	TDYPGTENMVIPTYVQAGD	16	2070.933	1	2073.657	0.224	1.567772	0.237623	6.219	0.004
152	170	TDYPGTENMVIPTYVQAGD	16	2070.933	2	2073.711	0.474	1.622114	0.4812	6.218	0.003
152	170	TDYPGTENMVIPTYVQAGD	16	2070.933	5	2074.239	0.357	2.150284	0.366139	6.22	0.008
159	165	NMVIPTY	5	837.418	0	837.971	0.005	0	0	7.633	0.006
159	165	NMVIPTY	5	837.418	0.25	840.897	0.001	2.926393	0.00522	7.634	9E-04
159	165	NMVIPTY	5	837.418	0.5	840.801	0.087	2.830054	0.087582	7.641	0.007
159	165	NMVIPTY	5	837.418	1	840.893	0.000	2.922906	0.005137	7.64	0
159	165	NMVIPTY	5	837.418	2	840.833	0.063	2.862723	0.063154	7.639	0.006
159	165	NMVIPTY	5	837.418	5	840.875	0.000	2.904188	0.005137	7.646	0
160	164	MVIPT	3	560.311	0	560.643	0.025	0	0	6.721	0.002
160	164	MVIPT	3	560.311	0.25	562.288	0.013	1.644834	0.028243	6.723	4E-04
160	164	MVIPT	3	560.311	0.5	562.181	0.034	1.537562	0.042556	6.728	0.007
160	164	MVIPT	3	560.311	1	562.190	0.008	1.546807	0.026466	6.734	0.003
160	164	MVIPT	3	560.311	2	562.106	0.019	1.462583	0.031611	6.734	0.005
160	164	MVIPT	3	560.311	5	562.206	0.119	1.562896	0.121797	6.728	0.006
160	165	MVIPTY	4	723.375	0	723.852	0.037	0	0	7.546	0.006
160	165	MVIPTY	4	723.375	0.25	725.501	0.000	1.649405	0.037422	7.548	0
160	165	MVIPTY	4	723.375	0.5	725.496	0.030	1.644123	0.047855	7.547	0.005
160	165	MVIPTY	4	723.375	1	725.410	0.025	1.558063	0.044811	7.554	0.002
160	165	MVIPTY	4	723.375	2	725.244	0.080	1.392221	0.088184	7.548	0.004
160	165	MVIPTY	4	723.375	5	725.276	0.025	1.424843	0.044864	7.555	0.002
160	167	MVIPTYVQ	6	950.502	0	951.051	0.023	0	0	7.428	0.003
160	167	MVIPTYVQ	6	950.502	0.25	955.075	0.068	4.024574	0.071741	7.43	9E-04
160	167	MVIPTYVQ	6	950.502	0.5	954.873	0.149	3.821895	0.150838	7.436	0.005
160	167	MVIPTYVQ	6	950.502	1	954.899	0.117	3.84814	0.119169	7.438	0.003
160	167	MVIPTYVQ	6	950.502	2	954.689	0.210	3.638516	0.211404	7.435	0.006
160	167	MVIPTYVQ	6	950.502	5	954.504	0.030	3.453788	0.037485	7.43	0.005
160	169	MVIPTYVQAG	8	1078.560	0	1079.167	0.062	0	0	7.358	0.005
160	169	MVIPTYVQAG	8	1078.560	0.25	1079.510	0.118	0.343492	0.133187	7.374	0.003
160	169	MVIPTYVQAG	8	1078.560	0.5	1079.607	0.098	0.440712	0.115957	7.375	0.006
160	169	MVIPTYVQAG	8	1078.560	1	1079.824	0.168	0.657266	0.179241	7.376	0.001
160	169	MVIPTYVQAG	8	1078.560	2	1080.162	0.133	0.995151	0.14719	7.371	0.003
160	169	MVIPTYVQAG	8	1078.560	5	1080.210	0.123	1.043527	0.137441	7.374	0.005
160	172	MVIPTYVQAGDSL	11	1393.703	0	1394.611	0.066	0	0	8.088	0.002
160	172	MVIPTYVQAGDSL	11	1393.703	0.25	1395.047	0.000	0.435898	0.066181	8.093	0
160	172	MVIPTYVQAGDSL	11	1393.703	0.5	1395.140	0.000	0.529206	0.066181	8.093	0
160	172	MVIPTYVQAGDSL	11	1393.703	1	1395.538	0.110	0.927258	0.128194	8.104	0.006
160	172	MVIPTYVQAGDSL	11	1393.703	2	1395.409	0.000	0.798199	0.066181	8.097	0
160	172	MVIPTYVQAGDSL	11	1393.703	5	1396.081	0.077	1.470121	0.101654	8.096	0.006
160	175	MVIPTYVQAGDSLPLT	13	1704.888	0	1706.048	0.066	0	0	8.258	0.005
160	175	MVIPTYVQAGDSLPLT	13	1704.888	0.25	1706.162	0.067	0.113473	0.093788	8.264	9E-04
160	175	MVIPTYVQAGDSLPLT	13	1704.888	0.5	1706.435	0.129	0.386183	0.144559	8.264	0.004
160	175	MVIPTYVQAGDSLPLT	13	1704.888	1	1706.688	0.209	0.639073	0.21872	8.269	0.003
160	175	MVIPTYVQAGDSLPLT	13	1704.888	2	1706.718	0.087	0.669468	0.10878	8.267	0.004
160	175	MVIPTYVQAGDSLPLT	13	1704.888	5	1707.317	0.133	1.268682	0.148754	8.265	0.005
160	176	MVIPTYVQAGDSLPLTV	14	1803.956	0	1805.048	0.036	0	0	8.708	0.005
160	176	MVIPTYVQAGDSLPLTV	14	1803.956	0.25	1805.288	0.017	0.240012	0.039639	8.719	0.001
160	176	MVIPTYVQAGDSLPLTV	14	1803.956	0.5	1805.367	0.067	0.31859	0.0758	8.719	0.007
160	176	MVIPTYVQAGDSLPLTV	14	1803.956	1	1805.410	0.053	0.362042	0.063771	8.722	0.002
160	176	MVIPTYVQAGDSLPLTV	14	1803.956	2	1805.506	0.090	0.457941	0.096572	8.719	0.005
160	176	MVIPTYVQAGDSLPLTV	14	1803.956	5	1805.708	0.081	0.659985	0.088565	8.718	0.004
161	165	VIPTY	3	592.334	0	592.629	0.005	0	0	6.501	0.005
161	165	VIPTY	3	592.334	0.25	594.209	0.004	1.580354	0.006393	6.505	0.002
161	165	VIPTY	3	592.334	0.5	594.189	0.048	1.560578	0.047847	6.511	0.005
161	165	VIPTY	3	592.334	1	594.193	0.012	1.564375	0.013299	6.515	0.004
161	165	VIPTY	3	592.334	2	594.090	0.016	1.461859	0.016766	6.514	0.004
161	165	VIPTY	3	592.334	5	594.089	0.025	1.460004	0.025523	6.51	0.005
166	173	VQAGDSLPL	6	786.399	0	786.789	0.041	0	0	6.255	0.106
166	173	VQAGDSLPL	6	786.399	0.25	789.955	0.000	3.165622	0.040557	6.042	0
166	173	VQAGDSLPL	6	786.399	0.5	789.812	0.148	3.023364	0.153358	6.271	0.115
166	173	VQAGDSLPL	6	786.399	1	789.970	0.055	3.181108	0.068257	6.274	0.114
166	173	VQAGDSLPL	6	786.399	2	789.687	0.145	2.897574	0.150905	6.244	0.006
166	173	VQAGDSLPL	6	786.399	5	789.518	0.000	2.728518	0.040557	6.673	0
166	174	VQAGDSLPL	7	899.483	0	899.900	0.023	0	0	7.389	0.005
166	174	VQAGDSLPL	7	899.483	0.25	903.492	0.015	3.592047	0.027666	7.388	8E-04
166	174	VQAGDSLPL	7	899.483	0.5	903.562	0.148	3.66275	0.150285	7.392	0.006
166	174	VQAGDSLPL	7	899.483	1	903.590	0.014	3.690578	0.027255	7.395	0.002
166	174	VQAGDSLPL	7	899.483	2	903.359	0.029	3.459353	0.037191	7.394	0.005
166	174	VQAGDSLPL	7	899.483	5	903.494	0.058	3.594506	0.062091	7.389	0.005
166	175	VQAGDSLPLT	8	1000.531	0	1001.020	0.023	0	0	6.831	0.003
166	175	VQAGDSLPLT	8	1000.531	0.25	1005.272	0.108	4.251605	0.110205	6.828	0.004
166	175	VQAGDSLPLT	8	1000.531	0.5	1005.298	0.191	4.277432	0.192037	6.829	0.008
166	175	VQAGDSLPLT	8	1000.531	1	1005.258	0.166	4.237792	0.167894	6.836	0.006
166	175	VQAGDSLPLT	8	1000.531	2	1004.993	0.158	3.972874	0.159809	6.833	0.008
166	175	VQAGDSLPLT	8	1000.531	5	1004.994	0.209	3.973444	0.210273	6.827	0.01
166	176	VQAGDSLPLTV	9	1099.599	0	1100.146	0.014	0	0	7.683	0.005
166	176	VQAGDSLPLTV	9	1099.599	0.25	1105.398	0.069	5.251825	0.070232	7.677	0.002

Start	Ende	Sequenz	MaxUptake	MHP	Exposure	Center	Center SD	Uptake	Uptake SD	RT	RT SD
166	176	VQAGDSLPLTV	9	1099.599	0.5	1105.400	0.036	5.254557	0.038707	7.681	0.006
166	176	VQAGDSLPLTV	9	1099.599	1	1105.329	0.043	5.183262	0.044947	7.687	0.004
166	176	VQAGDSLPLTV	9	1099.599	2	1105.092	0.034	4.946685	0.036563	7.681	0.006
166	176	VQAGDSLPLTV	9	1099.599	5	1104.258	0.061	4.112643	0.063114	7.681	0.006
166	177	VQAGDSLPLTVV	10	1198.668	0	1199.256	0.023	0	0	8.007	0.078
166	177	VQAGDSLPLTVV	10	1198.668	0.25	1205.149	0.133	5.892984	0.134685	7.988	0.003
166	177	VQAGDSLPLTVV	10	1198.668	0.5	1205.174	0.139	5.918061	0.140922	7.99	0.005
166	177	VQAGDSLPLTVV	10	1198.668	1	1205.116	0.148	5.860813	0.14973	7.994	0.004
166	177	VQAGDSLPLTVV	10	1198.668	2	1204.875	0.112	5.619703	0.114492	7.994	0.006
166	177	VQAGDSLPLTVV	10	1198.668	5	1204.788	0.138	5.532551	0.139631	7.991	0.005
166	178	VQAGDSLPLTVVD	11	1313.695	0	1314.334	0.085	0	0	7.629	0.005
166	178	VQAGDSLPLTVVD	11	1313.695	0.25	1320.798	0.101	6.464125	0.132206	7.623	0.003
166	178	VQAGDSLPLTVVD	11	1313.695	0.5	1320.780	0.139	6.445939	0.162883	7.625	0.005
166	178	VQAGDSLPLTVVD	11	1313.695	1	1320.770	0.158	6.435815	0.179138	7.629	0.004
166	178	VQAGDSLPLTVVD	11	1313.695	2	1320.541	0.146	6.206405	0.168893	7.631	9E-04
166	178	VQAGDSLPLTVVD	11	1313.695	5	1320.405	0.153	6.070355	0.174907	7.627	0.005
166	181	VQAGDSLPLTVVDQDT	14	1657.828	0	1658.733	0.057	0	0	7.659	0.002
166	181	VQAGDSLPLTVVDQDT	14	1657.828	0.25	1665.507	0.000	6.773775	0.056923	7.638	0
166	181	VQAGDSLPLTVVDQDT	14	1657.828	0.5	1665.033	0.000	6.300148	0.056923	7.651	0
166	181	VQAGDSLPLTVVDQDT	14	1657.828	2	1664.922	0.130	6.189221	0.141786	7.648	0.003
166	181	VQAGDSLPLTVVDQDT	14	1657.828	5	1664.830	0.114	6.097438	0.127017	7.648	0.005
166	182	VQAGDSLPLTVVDQDTY	15	1820.891	0	1821.943	0.068	0	0	7.999	0.001
166	182	VQAGDSLPLTVVDQDTY	15	1820.891	0.25	1828.427	0.160	6.484117	0.173788	7.995	0.003
166	182	VQAGDSLPLTVVDQDTY	15	1820.891	0.5	1828.357	0.000	6.413364	0.067707	7.993	0
166	182	VQAGDSLPLTVVDQDTY	15	1820.891	1	1828.322	0.136	6.37883	0.151638	8.005	0.003
166	182	VQAGDSLPLTVVDQDTY	15	1820.891	2	1827.960	0.405	6.016779	0.41069	8.008	0.004
166	182	VQAGDSLPLTVVDQDTY	15	1820.891	5	1827.963	0.198	6.019525	0.209487	8.007	0.007
168	182	AGDSLPLTVVDQDTY	13	1593.764	0	1594.575	0.033	0	0	7.965	0.002
168	182	AGDSLPLTVVDQDTY	13	1593.764	0.25	1601.546	0.057	6.971488	0.065731	7.935	0.002
168	182	AGDSLPLTVVDQDTY	13	1593.764	0.5	1601.595	0.023	7.020503	0.040651	7.941	5E-04
168	182	AGDSLPLTVVDQDTY	13	1593.764	1	1601.439	0.015	6.864136	0.036639	7.955	0.001
168	182	AGDSLPLTVVDQDTY	13	1593.764	2	1601.028	0.039	6.453462	0.051028	7.95	0.004
168	182	AGDSLPLTVVDQDTY	13	1593.764	5	1600.919	0.150	6.343839	0.153728	7.952	0.006
169	182	GDSLPLTVVDQDTY	12	1522.727	0	1523.477	0.063	0	0	8.215	0.006
169	182	GDSLPLTVVDQDTY	12	1522.727	0.5	1528.274	0.000	4.796619	0.062973	8.218	0
169	182	GDSLPLTVVDQDTY	12	1522.727	1	1528.728	0.084	5.251301	0.105347	8.228	0.004
169	182	GDSLPLTVVDQDTY	12	1522.727	5	1528.716	0.079	5.239305	0.101032	8.226	0.002
176	182	VVDQDTY	6	839.378	0	839.871	0.022	0	0	5.692	0.002
176	182	VVDQDTY	6	839.378	0.25	842.370	0.015	2.499006	0.026123	5.695	0.002
176	182	VVDQDTY	6	839.378	0.5	842.482	0.006	2.610496	0.022267	5.697	0.004
176	182	VVDQDTY	6	839.378	1	842.562	0.023	2.691279	0.03177	5.7	0.004
176	182	VVDQDTY	6	839.378	2	842.503	0.126	2.632196	0.127601	5.696	0.004
176	182	VVDQDTY	6	839.378	5	842.535	0.017	2.664174	0.027336	5.695	0.006
176	183	VVDQDTYY	7	1002.442	0	1002.908	0.025	0	0	6.667	0.006
176	183	VVDQDTYY	7	1002.442	0.25	1006.354	0.015	3.446403	0.028738	6.674	0.008
176	183	VVDQDTYY	7	1002.442	0.5	1006.559	0.122	3.651004	0.124099	6.671	0.006
176	183	VVDQDTYY	7	1002.442	1	1006.510	0.060	3.602328	0.065296	6.676	0.006
176	183	VVDQDTYY	7	1002.442	2	1006.446	0.086	3.538491	0.089923	6.678	0.006
176	183	VVDQDTYY	7	1002.442	5	1006.340	0.010	3.432654	0.026751	6.684	0.002
177	182	VDQDTY	5	740.310	0	740.754	0.027	0	0	5.451	0.002
177	182	VDQDTY	5	740.310	0.25	742.671	0.002	1.917598	0.0274	5.454	0.003
177	182	VDQDTY	5	740.310	0.5	742.764	0.011	2.010057	0.02938	5.455	0.004
177	182	VDQDTY	5	740.310	1	742.813	0.003	2.059423	0.027406	5.459	0.004
177	182	VDQDTY	5	740.310	2	742.789	0.081	2.035161	0.085161	5.457	0.006
177	182	VDQDTY	5	740.310	5	742.773	0.019	2.019562	0.03332	5.456	0.006
177	183	VDQDTYY	6	903.373	0	903.789	0.018	0	0	6.561	0.003
177	183	VDQDTYY	6	903.373	0.25	906.535	0.055	2.746046	0.05762	6.56	0.002
177	183	VDQDTYY	6	903.373	0.5	906.628	0.019	2.839351	0.026335	6.567	0.005
177	183	VDQDTYY	6	903.373	1	906.607	0.038	2.817722	0.042422	6.573	0.002
177	183	VDQDTYY	6	903.373	2	906.572	0.045	2.78299	0.048337	6.572	0.003
177	183	VDQDTYY	6	903.373	5	906.573	0.066	2.783891	0.068056	6.567	0.006
182	186	YTWQ	4	760.330	0	760.685	0.054	0	0	7.369	0.163
182	186	YTWQ	4	760.330	0.25	762.923	0.018	2.238462	0.057188	7.603	0.003
182	186	YTWQ	4	760.330	0.5	762.938	0.068	2.253807	0.086747	7.257	0.004
182	186	YTWQ	4	760.330	1	762.959	0.076	2.274867	0.09306	7.262	0.003
182	186	YTWQ	4	760.330	2	762.776	0.021	2.091905	0.057985	7.26	0.003
182	186	YTWQ	4	760.330	5	762.774	0.025	2.089866	0.05987	7.509	0.166
182	194	YTWQGLKTSAQY	12	1608.769	0	1609.835	0.050	0	0	7.567	0.006
182	194	YTWQGLKTSAQY	12	1608.769	0.25	1616.024	0.039	6.188794	0.063087	7.564	0.001
182	194	YTWQGLKTSAQY	12	1608.769	0.5	1616.134	0.037	6.299249	0.062013	7.575	0.003
182	194	YTWQGLKTSAQY	12	1608.769	1	1616.063	0.013	6.227871	0.051155	7.582	0.004
182	194	YTWQGLKTSAQY	12	1608.769	2	1615.953	0.030	6.117934	0.057809	7.586	0.006
182	194	YTWQGLKTSAQY	12	1608.769	5	1615.905	0.053	6.07006	0.072327	7.588	0.005
183	186	YTWQ	3	597.267	0	597.554	0.004	0	0	6.967	0.004
183	186	YTWQ	3	597.267	0.25	599.061	0.001	1.506895	0.003827	6.973	2E-04
183	186	YTWQ	3	597.267	0.5	599.038	0.041	1.483817	0.041253	6.978	0.004
183	186	YTWQ	3	597.267	1	599.073	0.069	1.519182	0.068955	6.984	0.002
183	186	YTWQ	3	597.267	2	599.001	0.029	1.447693	0.02929	6.982	0.005
183	186	YTWQ	3	597.267	5	598.974	0.016	1.420711	0.016142	6.981	0.006
183	187	YTWQG	4	654.288	0	654.561	0.054	0	0	6.911	0.002
183	187	YTWQG	4	654.288	0.25	656.805	0.002	2.244485	0.054382	6.918	0.004
183	187	YTWQG	4	654.288	0.5	656.776	0.064	2.215415	0.084326	6.923	0.003
183	187	YTWQG	4	654.288	1	656.786	0.018	2.225704	0.057266	6.925	0.002
183	187	YTWQG	4	654.288	2	656.737	0.046	2.176113	0.071101	6.925	0.003
183	187	YTWQG	4	654.288	5	656.718	0.039	2.157518	0.066799	6.925	0.007
183	188	YTWQGL	5	767.372	0	767.774	0.023	0	0	8.377	0.006
183	188	YTWQGL	5	767.372	0.25	770.476	0.080	2.702255	0.082884	8.382	6E-04
183	188	YTWQGL	5	767.372	0.5	770.527	0.072	2.752609	0.075177	8.386	0.005
183	188	YTWQGL	5	767.372	1	770.572	0.005	2.79838	0.023641	8.388	0.002
183	188	YTWQGL	5	767.372	2	770.425	0.148	2.65124	0.150166	8.392	0.002
183	188	YTWQGL	5	767.372	5	770.462	0.036	2.688419	0.04247	8.386	0.005
183	190	YTWQGLKT	7	996.515	0	997.167	0.079	0	0	6.988	0.007
183	190	YTWQGLKT	7	996.515	0.25	1001.194	0.043	4.02675	0.089455	6.992	0.003
183	190	YTWQGLKT	7	996.515	0.5	1001.231	0.039	4.063776	0.087854	7	0.006
183	190	YTWQGLKT	7	996.515	1	1001.184	0.033	4.016943	0.085246	7.006	0.003
183	190	YTWQGLKT	7	996.515	2	1000.997	0.185	3.829117	0.200659	7.006	0.005
183	190	YTWQGLKT	7	996.515	5	1001.048	0.030	3.880563	0.083968	7.005	0.006

Start	Ende	Sequenz	MaxUptake	MHP	Exposure	Center	Center SD	Uptake	Uptake SD	RT	RT SD
183	193	YTWQGLK TSAQ	10	1282.643	0	1283.749	0.171	0	0	6.757	0.005
183	193	YTWQGLK TSAQ	10	1282.643	0.25	1289.393	0.195	5.64418	0.259423	6.759	0.003
183	193	YTWQGLK TSAQ	10	1282.643	0.5	1289.468	0.173	5.719362	0.243336	6.763	0.004
183	193	YTWQGLK TSAQ	10	1282.643	1	1289.415	0.183	5.665585	0.250517	6.768	0.003
183	193	YTWQGLK TSAQ	10	1282.643	2	1289.113	0.255	5.364248	0.307194	6.766	0.002
183	193	YTWQGLK TSAQ	10	1282.643	5	1289.234	0.194	5.484812	0.25878	6.766	0.006
183	194	YTWQGLK TSAQY	11	1445.706	0	1446.990	0.154	0	0	7.196	0.006
183	194	YTWQGLK TSAQY	11	1445.706	0.25	1452.652	0.060	5.661709	0.165818	7.197	8E-04
183	194	YTWQGLK TSAQY	11	1445.706	0.5	1452.786	0.046	5.795513	0.161203	7.204	0.005
183	194	YTWQGLK TSAQY	11	1445.706	1	1452.699	0.070	5.708626	0.169392	7.212	0.003
183	194	YTWQGLK TSAQY	11	1445.706	2	1452.369	0.234	5.378793	0.280434	7.211	0.006
183	194	YTWQGLK TSAQY	11	1445.706	5	1452.511	0.031	5.521023	0.157501	7.209	0.007
184	190	TWQGLKT	6	833.452	0	833.816	0.059	0	0	6.341	0.009
184	190	TWQGLKT	6	833.452	0.25	837.418	0.012	3.601584	0.06069	6.345	0.003
184	190	TWQGLKT	6	833.452	0.5	837.303	0.109	3.486164	0.123988	6.35	0.006
184	190	TWQGLKT	6	833.452	1	837.273	0.075	3.456855	0.095399	6.358	0.005
184	190	TWQGLKT	6	833.452	2	837.100	0.130	3.284064	0.143302	6.356	0.004
184	190	TWQGLKT	6	833.452	5	837.106	0.057	3.289309	0.082676	6.355	0.006
184	193	TWQGLK TSAQ	9	1119.579	0	1120.252	0.055	0	0	6.088	0.005
184	193	TWQGLK TSAQ	9	1119.579	0.25	1125.766	0.029	5.514427	0.062409	6.089	0.003
184	193	TWQGLK TSAQ	9	1119.579	0.5	1125.656	0.126	5.403874	0.137268	6.097	0.005
184	193	TWQGLK TSAQ	9	1119.579	1	1125.542	0.057	5.290623	0.07906	6.1	0.003
184	193	TWQGLK TSAQ	9	1119.579	2	1125.322	0.128	5.070618	0.13897	6.103	0.002
184	193	TWQGLK TSAQ	9	1119.579	5	1125.361	0.059	5.109158	0.080628	6.097	0.005
185	193	WQGLK TSAQ	8	1018.532	0	1019.089	0.030	0	0	5.882	0.04
185	193	WQGLK TSAQ	8	1018.532	0.25	1023.728	0.120	4.63833	0.12329	5.89	0.004
185	193	WQGLK TSAQ	8	1018.532	0.5	1023.991	0.169	4.9018	0.171828	5.896	0.004
185	193	WQGLK TSAQ	8	1018.532	1	1024.008	0.267	4.918697	0.268649	5.901	0.007
185	193	WQGLK TSAQ	8	1018.532	2	1023.504	0.000	4.415062	0.03015	5.898	0
185	193	WQGLK TSAQ	8	1018.532	5	1023.438	0.003	4.348818	0.030269	5.891	0.005
194	202	YVNNAGIS	8	1000.473	0	1001.036	0.027	0	0	6.369	0.004
194	202	YVNNAGIS	8	1000.473	0.25	1002.408	0.135	1.371623	0.137271	6.375	0.004
194	202	YVNNAGIS	8	1000.473	0.5	1002.541	0.160	1.50427	0.161862	6.377	0.005
194	202	YVNNAGIS	8	1000.473	1	1002.670	0.170	1.633763	0.172305	6.382	0.005
194	202	YVNNAGIS	8	1000.473	2	1002.747	0.162	1.710262	0.16429	6.376	0.004
194	202	YVNNAGIS	8	1000.473	5	1003.012	0.175	1.97564	0.177038	6.379	0.007
194	203	YVNNAGISV	9	1099.542	0	1100.085	0.026	0	0	7.232	0.007
194	203	YVNNAGISV	9	1099.542	0.25	1102.119	0.196	2.033956	0.197912	7.231	0.008
194	203	YVNNAGISV	9	1099.542	0.5	1102.807	0.232	2.722049	0.233788	7.216	0.023
194	203	YVNNAGISV	9	1099.542	1	1102.792	0.100	2.707475	0.102835	7.245	0.004
194	203	YVNNAGISV	9	1099.542	2	1102.563	0.212	2.478101	0.213921	7.244	0.004
194	203	YVNNAGISV	9	1099.542	5	1102.833	0.181	2.748189	0.182481	7.239	0.007
194	204	YVNNAGISVE	10	1228.584	0	1229.333	0.089	0	0	6.851	0.007
194	204	YVNNAGISVE	10	1228.584	0.25	1231.280	0.246	1.94638	0.261226	6.856	0.004
194	204	YVNNAGISVE	10	1228.584	0.5	1231.615	0.097	2.281226	0.131681	6.859	0.005
194	204	YVNNAGISVE	10	1228.584	1	1231.985	0.048	2.651851	0.101291	6.865	0.004
194	204	YVNNAGISVE	10	1228.584	2	1232.134	0.158	2.800301	0.181159	6.867	0.004
194	204	YVNNAGISVE	10	1228.584	5	1232.624	0.088	3.290638	0.125357	6.858	0.009
195	202	YVNNAGIS	7	837.410	0	837.948	0.048	0	0	5.473	0.004
195	202	YVNNAGIS	7	837.410	0.25	839.640	0.030	1.692245	0.056375	5.476	0.002
195	202	YVNNAGIS	7	837.410	0.5	839.580	0.120	1.631951	0.128819	5.48	0.003
195	202	YVNNAGIS	7	837.410	1	839.739	0.123	1.791675	0.132145	5.483	0.005
195	202	YVNNAGIS	7	837.410	2	839.831	0.091	1.883259	0.103005	5.482	0.005
195	202	YVNNAGIS	7	837.410	5	840.049	0.015	2.101907	0.050353	5.479	0.005
195	203	YVNNAGISV	8	936.479	0	936.966	0.017	0	0	6.636	0.007
195	203	YVNNAGISV	8	936.479	0.25	939.099	0.000	2.132631	0.017411	6.626	0
195	203	YVNNAGISV	8	936.479	0.5	939.365	0.000	2.398179	0.017411	6.629	0
195	203	YVNNAGISV	8	936.479	1	939.547	0.011	2.580805	0.020718	6.636	0.005
195	203	YVNNAGISV	8	936.479	2	939.667	0.094	2.700824	0.095578	6.635	0.004
195	203	YVNNAGISV	8	936.479	5	939.910	0.016	2.943207	0.023582	6.633	0.006
195	204	YVNNAGISVE	9	1065.521	0	1066.196	0.071	0	0	6.235	0.004
195	204	YVNNAGISVE	9	1065.521	0.25	1068.103	0.193	1.906824	0.205817	6.24	0.002
195	204	YVNNAGISVE	9	1065.521	0.5	1068.446	0.179	2.250062	0.192568	6.243	0.005
195	204	YVNNAGISVE	9	1065.521	1	1068.720	0.169	2.524165	0.18299	6.246	0.003
195	204	YVNNAGISVE	9	1065.521	2	1068.912	0.238	2.716333	0.24866	6.246	0.005
195	204	YVNNAGISVE	9	1065.521	5	1069.325	0.259	3.128849	0.268314	6.243	0.004
198	204	NAGISVE	6	689.346	0	689.659	0.010	0	0	5.852	0.006
198	204	NAGISVE	6	689.346	0.25	693.174	0.044	3.515278	0.045633	5.855	4E-04
198	204	NAGISVE	6	689.346	0.5	693.156	0.075	3.497142	0.075483	5.857	0.006
198	204	NAGISVE	6	689.346	1	693.128	0.014	3.469476	0.017495	5.859	0.002
198	204	NAGISVE	6	689.346	2	692.939	0.035	3.28018	0.036288	5.861	0.004
198	204	NAGISVE	6	689.346	5	692.983	0.031	3.324174	0.032624	5.859	0.004
209	224	WGSSSSGVGNWAPLNF	14	1665.766	0	1666.656	0.045	0	0	9.304	0.004
209	224	WGSSSSGVGNWAPLNF	14	1665.766	0.25	1666.714	0.103	0.057994	0.112018	9.316	0.004
209	224	WGSSSSGVGNWAPLNF	14	1665.766	0.5	1667.050	0.042	0.39446	0.061338	9.314	8E-04
209	224	WGSSSSGVGNWAPLNF	14	1665.766	1	1667.078	0.036	0.422375	0.057711	9.319	0.003
209	224	WGSSSSGVGNWAPLNF	14	1665.766	2	1667.115	0.088	0.459521	0.098595	9.321	0.006
209	224	WGSSSSGVGNWAPLNF	14	1665.766	5	1667.190	0.045	0.533685	0.063493	9.32	0.004
220	224	APLNF	3	561.303	0	561.593	0.010	0	0	7.624	0.009
220	224	APLNF	3	561.303	0.25	561.642	0.019	0.04852	0.021521	7.63	0.002
220	224	APLNF	3	561.303	0.5	561.550	0.004	-0.04373	0.010686	7.633	0.006
220	224	APLNF	3	561.303	1	561.557	0.009	-0.03685	0.013719	7.638	0.001
220	224	APLNF	3	561.303	2	561.655	0.010	0.061738	0.014044	7.635	0.005
220	224	APLNF	3	561.303	5	561.589	0.053	-0.00397	0.054072	7.631	0.005
220	234	APLNFAGAGSSDGVAY	13	1425.665	0	1426.295	0.105	0	0	7.711	0.004
220	234	APLNFAGAGSSDGVAY	13	1425.665	1	1427.808	0.006	1.512953	0.104881	7.72	8E-04
220	234	APLNFAGAGSSDGVAY	13	1425.665	2	1428.065	0.072	1.770431	0.126853	7.724	0.002
220	234	APLNFAGAGSSDGVAY	13	1425.665	5	1428.042	0.012	1.74673	0.105413	7.724	0.001
224	234	FGAGSSDGVAY	10	1030.448	0	1030.968	0.010	0	0	6.807	0.033
224	234	FGAGSSDGVAY	10	1030.448	0.25	1035.791	0.037	4.822913	0.038554	6.804	0.002
224	234	FGAGSSDGVAY	10	1030.448	0.5	1035.724	0.141	4.755912	0.140832	6.807	0.006
224	234	FGAGSSDGVAY	10	1030.448	1	1035.723	0.033	4.755365	0.034252	6.815	0.003
224	234	FGAGSSDGVAY	10	1030.448	2	1035.412	0.108	4.443731	0.108329	6.813	0.006
224	234	FGAGSSDGVAY	10	1030.448	5	1035.487	0.025	4.518688	0.027145	6.808	0.008
224	235	FGAGSSDGVAYL	11	1143.532	0	1144.110	0.017	0	0	7.989	0.003
224	235	FGAGSSDGVAYL	11	1143.532	0.25	1148.176	0.295	4.065904	0.29506	7.994	0.002
224	235	FGAGSSDGVAYL	11	1143.532	0.5	1148.482	0.069	4.372554	0.071469	7.996	0.008
224	235	FGAGSSDGVAYL	11	1143.532	1	1147.926	0.381	3.815765	0.381672	8.011	0.009

Start	Ende	Sequenz	MaxUptake	MHP	Exposure	Center	Center SD	Uptake	Uptake SD	RT	RT SD
224	235	FGAGSSDGVAYL	11	1143.532	2	1147.946	0.168	3.836032	0.168765	8.002	0.008
224	235	FGAGSSDGVAYL	11	1143.532	5	1147.915	0.172	3.804895	0.172944	8.001	0.007
225	234	GAGSSDGVAY	9	883.379	0	883.977	0.096	0	0	5.931	0.006
225	234	GAGSSDGVAY	9	883.379	0.25	885.108	0.014	1.130696	0.097404	5.935	8E-04
225	234	GAGSSDGVAY	9	883.379	0.5	885.158	0.049	1.180261	0.108322	5.938	0.006
225	234	GAGSSDGVAY	9	883.379	1	885.209	0.079	1.23182	0.124698	5.939	0.002
225	234	GAGSSDGVAY	9	883.379	2	885.288	0.122	1.31101	0.155718	5.939	0.003
225	234	GAGSSDGVAY	9	883.379	5	885.551	0.131	1.573723	0.163054	5.938	0.005
225	235	GAGSSDGVAYL	10	996.463	0	997.066	0.059	0	0	7.395	0.007
225	235	GAGSSDGVAYL	10	996.463	0.25	998.015	0.167	0.94808	0.177128	7.4	0.002
225	235	GAGSSDGVAYL	10	996.463	0.5	998.070	0.185	1.003005	0.193863	7.404	0.006
225	235	GAGSSDGVAYL	10	996.463	1	998.152	0.186	1.085889	0.195042	7.408	0.002
225	235	GAGSSDGVAYL	10	996.463	2	998.193	0.213	1.126114	0.220803	7.405	0.005
225	235	GAGSSDGVAYL	10	996.463	5	998.445	0.222	1.378005	0.229697	7.403	0.006
230	235	DGVAYL	5	637.319	0	638.040	0.128	0	0	7.651	0.003
230	235	DGVAYL	5	637.319	0.25	638.197	0.000	0.157581	0.127836	7.653	0
230	235	DGVAYL	5	637.319	0.5	637.986	0.235	-0.05384	0.267518	7.661	0.006
230	235	DGVAYL	5	637.319	1	637.949	0.246	-0.0906	0.277619	7.664	6E-04
230	235	DGVAYL	5	637.319	2	638.117	0.158	0.077241	0.202921	7.662	0.004
230	235	DGVAYL	5	637.319	5	637.907	0.195	-0.13217	0.233406	7.662	0.004
232	235	VAYL	3	465.271	0	465.511	0.012	0	0	7.184	0.008
232	235	VAYL	3	465.271	0.25	465.530	0.002	0.019538	0.012376	7.188	0.001
232	235	VAYL	3	465.271	0.5	465.568	0.006	0.057029	0.013642	7.188	0.004
232	235	VAYL	3	465.271	1	465.574	0.010	0.062812	0.015941	7.193	0.003
232	235	VAYL	3	465.271	2	465.598	0.012	0.087424	0.017007	7.19	0.004
232	235	VAYL	3	465.271	5	465.570	0.011	0.059215	0.016616	7.191	0.006
236	244	SLIPNPNNG	6	925.474	0	925.876	0.029	0	0	6.521	0.002
236	244	SLIPNPNNG	6	925.474	0.25	928.864	0.084	2.988163	0.088547	6.524	0.003
236	244	SLIPNPNNG	6	925.474	0.5	928.992	0.085	3.1157	0.089541	6.533	0.006
236	244	SLIPNPNNG	6	925.474	1	929.084	0.090	3.207845	0.094441	6.537	0.003
236	244	SLIPNPNNG	6	925.474	2	928.991	0.149	3.115262	0.151741	6.537	0.005
236	244	SLIPNPNNG	6	925.474	5	928.981	0.036	3.104917	0.046548	6.531	0.005
236	249	SLIPNPNNGNALNF	11	1484.749	0	1485.966	0.171	0	0	8.215	0.007
236	249	SLIPNPNNGNALNF	11	1484.749	0.25	1489.338	0.066	3.372019	0.018355	8.218	1E-03
236	249	SLIPNPNNGNALNF	11	1484.749	0.5	1489.680	0.100	3.713343	0.019883	8.221	0.004
236	249	SLIPNPNNGNALNF	11	1484.749	1	1489.858	0.110	3.891831	0.020387	8.225	0.003
236	249	SLIPNPNNGNALNF	11	1484.749	2	1489.722	0.227	3.755731	0.028415	8.223	0.005
236	249	SLIPNPNNGNALNF	11	1484.749	5	1489.631	0.158	3.664319	0.023393	8.221	0.006
238	249	IPNPNNGNALNF	9	1284.633	0	1285.393	0.054	0	0	7.59	0.005
238	249	IPNPNNGNALNF	9	1284.633	0.25	1289.213	0.120	3.820869	0.131837	7.589	0.002
238	249	IPNPNNGNALNF	9	1284.633	0.5	1289.561	0.133	4.168264	0.143691	7.589	0.001
238	249	IPNPNNGNALNF	9	1284.633	1	1289.729	0.139	4.33657	0.149244	7.593	0.003
238	249	IPNPNNGNALNF	9	1284.633	2	1289.581	0.203	4.188187	0.20967	7.592	0.005
238	249	IPNPNNGNALNF	9	1284.633	5	1289.558	0.154	4.165559	0.16268	7.591	0.005
239	249	PNPNNNGNALNF	8	1171.549	0	1172.146	0.008	0	0	8.215	0.003
239	249	PNPNNNGNALNF	8	1171.549	0.25	1174.375	0.057	2.229399	0.058018	8.218	0.001
239	249	PNPNNNGNALNF	8	1171.549	0.5	1174.479	0.061	2.332544	0.061532	8.217	0.004
239	249	PNPNNNGNALNF	8	1171.549	1	1174.654	0.069	2.508363	0.069314	8.224	0.005
239	249	PNPNNNGNALNF	8	1171.549	2	1174.601	0.156	2.454659	0.156376	8.223	0.003
239	249	PNPNNNGNALNF	8	1171.549	5	1174.562	0.012	2.415832	0.014367	8.221	0.005
245	249	NALNF	4	578.293	0	578.501	0.010	0	0	7.588	0.006
245	249	NALNF	4	578.293	0.25	580.317	0.006	1.816672	0.01141	7.586	0.002
245	249	NALNF	4	578.293	0.5	580.382	0.064	1.881528	0.064887	7.593	0.007
245	249	NALNF	4	578.293	1	580.419	0.058	1.918346	0.058604	7.596	7E-04
245	249	NALNF	4	578.293	2	580.396	0.045	1.895265	0.046461	7.593	0.007
245	249	NALNF	4	578.293	5	580.336	0.015	1.835035	0.018176	7.592	0.004
250	255	NVKIVA	5	643.414	0	643.813	0.034	0	0	5.343	0.011
250	255	NVKIVA	5	643.414	0.25	644.555	0.014	0.741573	0.037017	5.34	0.001
250	255	NVKIVA	5	643.414	0.5	644.591	0.029	0.778317	0.044533	5.344	0.005
250	255	NVKIVA	5	643.414	1	644.601	0.017	0.7878	0.038304	5.351	0.007
250	255	NVKIVA	5	643.414	2	644.549	0.040	0.735603	0.052886	5.354	0.008
250	255	NVKIVA	5	643.414	5	644.559	0.025	0.746089	0.042211	5.354	0.009
250	256	NVKIVAA	6	714.451	0	714.874	0.021	0	0	5.245	0.01
250	256	NVKIVAA	6	714.451	0.25	715.975	0.094	1.101524	0.096282	5.24	0.004
250	256	NVKIVAA	6	714.451	0.5	716.130	0.040	1.256093	0.045056	5.246	0.004
250	256	NVKIVAA	6	714.451	1	716.229	0.029	1.3547	0.03613	5.25	0.004
250	256	NVKIVAA	6	714.451	2	716.207	0.037	1.332974	0.042285	5.251	0.005
250	256	NVKIVAA	6	714.451	5	716.186	0.040	1.311697	0.045404	5.25	0.006
250	257	NVKIVAAD	7	829.478	0	829.944	0.047	0	0	5.152	0.007
250	257	NVKIVAAD	7	829.478	0.25	831.702	0.030	1.758035	0.05624	5.153	0.003
250	257	NVKIVAAD	7	829.478	0.5	831.766	0.096	1.822583	0.107011	5.153	0.004
250	257	NVKIVAAD	7	829.478	1	831.856	0.098	1.911915	0.108876	5.161	0.006
250	257	NVKIVAAD	7	829.478	2	831.802	0.101	1.85801	0.111884	5.158	0.007
250	257	NVKIVAAD	7	829.478	5	831.822	0.076	1.877836	0.089534	5.16	0.007
250	258	NVKIVAADD	8	944.505	0	945.063	0.052	0	0	5.205	0.003
250	258	NVKIVAADD	8	944.505	0.25	946.869	0.054	1.806244	0.074635	5.21	0.002
250	258	NVKIVAADD	8	944.505	0.5	947.038	0.034	1.974591	0.06209	5.209	0.005
250	258	NVKIVAADD	8	944.505	1	947.128	0.051	2.065302	0.072415	5.218	0.005
250	258	NVKIVAADD	8	944.505	2	947.090	0.059	2.026892	0.078106	5.217	0.006
250	258	NVKIVAADD	8	944.505	5	947.077	0.047	2.014342	0.069944	5.216	0.006
250	260	NVKIVAADDSS	10	1118.569	0	1119.170	0.045	0	0	5.104	0.004
250	260	NVKIVAADDSS	10	1118.569	0.25	1122.008	0.039	2.838185	0.059145	5.105	0.004
250	260	NVKIVAADDSS	10	1118.569	0.5	1122.199	0.070	3.029133	0.082763	5.111	0.003
250	260	NVKIVAADDSS	10	1118.569	1	1122.329	0.048	3.15903	0.065711	5.114	0.002
250	260	NVKIVAADDSS	10	1118.569	2	1122.264	0.061	3.094703	0.075802	5.114	0.004
250	260	NVKIVAADDSS	10	1118.569	5	1122.246	0.029	3.076928	0.053004	5.116	0.004
250	264	NVKIVAADDSSSTVNG	14	1489.749	0	1490.613	0.024	0	0	5.427	0.004
250	264	NVKIVAADDSSSTVNG	14	1489.749	0.25	1495.416	0.050	4.802389	0.055979	5.432	0.001
250	264	NVKIVAADDSSSTVNG	14	1489.749	0.5	1495.644	0.041	5.030399	0.047825	5.437	0.008
250	264	NVKIVAADDSSSTVNG	14	1489.749	1	1495.818	0.046	5.204416	0.052032	5.441	0.001
250	264	NVKIVAADDSSSTVNG	14	1489.749	2	1495.709	0.109	5.09529	0.1121	5.441	0.006
250	264	NVKIVAADDSSSTVNG	14	1489.749	5	1495.709	0.008	5.096157	0.02562	5.439	0.004
250	266	NVKIVAADDSSSTVNGEC	16	1721.801	0	1722.753	0.006	0	0	5.88	0.004
250	266	NVKIVAADDSSSTVNGEC	16	1721.801	0.25	1728.758	0.154	6.005097	0.153838	5.89	0.006
250	266	NVKIVAADDSSSTVNGEC	16	1721.801	0.5	1729.373	0.319	6.620201	0.319176	5.896	0.005
250	266	NVKIVAADDSSSTVNGEC	16	1721.801	1	1729.154	0.086	6.400777	0.085927	5.905	0.009
250	266	NVKIVAADDSSSTVNGEC	16	1721.801	2	1728.883	0.352	6.129758	0.352174	5.897	0.006

Start	Ende	Sequenz	MaxUptake	MHP	Exposure	Center	Center SD	Uptake	Uptake SD	RT	RT SD
250	266	NVKIVAADDSSVTNGEC	16	1721.801	5	1728.908	0.050	6.155274	0.050299	5.9	0.007
261	268	TVNGECIY	7	898.398	0	899.281	0.170	0	0	5.791	0.005
261	268	TVNGECIY	7	898.398	0.25	899.157	0.026	-0.12395	0.171905	5.798	0.004
261	268	TVNGECIY	7	898.398	0.5	899.108	0.061	-0.17255	0.180525	5.801	0.003
261	268	TVNGECIY	7	898.398	1	899.125	0.033	-0.15616	0.173192	5.808	0.007
261	268	TVNGECIY	7	898.398	2	899.171	0.035	-0.11022	0.173479	5.808	0.004
261	268	TVNGECIY	7	898.398	5	899.149	0.046	-0.13222	0.176121	5.809	0.007
292	295	VLYN	3	508.277	0	508.918	0.086	0	0	5.615	0.004
292	295	VLYN	3	508.277	0.25	509.108	0.008	0.190139	0.085928	5.621	0.001
292	295	VLYN	3	508.277	0.5	509.164	0.018	0.246042	0.087367	5.621	0.004
292	295	VLYN	3	508.277	1	509.205	0.021	0.287109	0.088139	5.624	0.003
292	295	VLYN	3	508.277	2	509.280	0.048	0.361239	0.09803	5.622	0.004
292	295	VLYN	3	508.277	5	509.395	0.007	0.476898	0.085905	5.622	0.006

holoScSun4C pH8.0

Start	End	Sequence	MaxUptake	MHP	Exposure	Center	Center SD	Uptake	Uptake SD	RT	RT SD
11	18	SSGLVPRG	6	772.431	0	772.8816	0.069997	0	0	5.225	0.007
11	18	SSGLVPRG	6	772.431	0.25	776.35	0.036292	3.468322	0.078846	5.232	0.003
11	18	SSGLVPRG	6	772.431	0.5	776.3431	0.03399	3.461495	0.077814	5.228	0.005
11	18	SSGLVPRG	6	772.431	1	776.3365	0.050093	3.454887	0.086075	5.232	0.002
11	18	SSGLVPRG	6	772.431	2	776.1793	0.071526	3.297623	0.100078	5.232	0.002
11	18	SSGLVPRG	6	772.431	5	776.1497	0.059829	3.268029	0.092082	5.229	0.005
11	28	SSGLVPRGSHNGSIYGD	16	1815.9	0	1817.198	0.072311	0	0	6.851	0.006
11	28	SSGLVPRGSHNGSIYGD	16	1815.9	0.25	1822.671	0.234475	5.472348	0.245372	6.864	0.001
11	28	SSGLVPRGSHNGSIYGD	16	1815.9	0.5	1823.151	0.016317	5.952227	0.074129	6.864	0.005
11	28	SSGLVPRGSHNGSIYGD	16	1815.9	1	1823.467	0.008866	6.268836	0.072852	6.868	0.002
11	28	SSGLVPRGSHNGSIYGD	16	1815.9	2	1823.443	0.128089	6.244319	0.147091	6.878	0.008
11	28	SSGLVPRGSHNGSIYGD	16	1815.9	5	1823.544	0.116415	6.345633	0.137045	6.883	0.01
12	17	SGLVPR	4	628.378	0	628.7021	0.021991	0	0	5.137	0.008
12	17	SGLVPR	4	628.378	0.25	630.836	0.086233	2.133955	0.088993	5.142	0.005
12	17	SGLVPR	4	628.378	0.5	630.8348	0.099716	2.13268	0.102112	5.139	0.005
12	17	SGLVPR	4	628.378	1	630.815	0.089314	2.112956	0.091981	5.143	0.002
12	17	SGLVPR	4	628.378	2	630.7203	0.070936	2.018205	0.074267	5.143	0.003
12	17	SGLVPR	4	628.378	5	630.6814	0.054061	1.979351	0.058363	5.142	0.005
12	18	SGLVPRG	5	685.399	0	685.973	0.088512	0	0	5.238	0.007
12	18	SGLVPRG	5	685.399	0.25	688.6598	0.023919	2.686739	0.091687	5.247	0.003
12	18	SGLVPRG	5	685.399	0.5	688.6559	0.020676	2.68283	0.090895	5.243	0.005
12	18	SGLVPRG	5	685.399	1	688.6248	0.027077	2.651771	0.092561	5.247	7E-04
12	18	SGLVPRG	5	685.399	2	688.4932	0.027375	2.520104	0.092649	5.246	0.003
12	18	SGLVPRG	5	685.399	5	688.4736	0.033355	2.500506	0.094589	5.244	0.004
12	25	SGLVPRGSHNGSIY	12	1443.73	0	1444.423	0.073829	0	0	5.872	0.011
12	25	SGLVPRGSHNGSIY	12	1443.73	0.25	1449.12	0.253749	4.697088	0.264272	5.874	2E-04
12	25	SGLVPRGSHNGSIY	12	1443.73	0.5	1449.211	0.050121	4.788805	0.089235	5.875	0.005
12	25	SGLVPRGSHNGSIY	12	1443.73	1	1449.392	0.018587	4.969798	0.076133	5.89	0.006
12	25	SGLVPRGSHNGSIY	12	1443.73	2	1449.295	0.087939	4.872816	0.114821	5.888	0.002
12	25	SGLVPRGSHNGSIY	12	1443.73	5	1449.299	0.112589	4.876409	0.134637	5.887	0.005
12	27	SGLVPRGSHNGSIYGD	14	1615.78	0	1616.639	0.026364	0	0	5.787	0.009
12	27	SGLVPRGSHNGSIYGD	14	1615.78	0.25	1621.892	0.378375	5.252934	0.379292	5.802	0.002
12	27	SGLVPRGSHNGSIYGD	14	1615.78	0.5	1622.528	0.371998	5.889353	0.372931	5.795	0.008
12	27	SGLVPRGSHNGSIYGD	14	1615.78	1	1622.597	0.320925	5.958002	0.322006	5.802	0.002
12	27	SGLVPRGSHNGSIYGD	14	1615.78	2	1622.365	0.44504	5.725963	0.44582	5.801	0.003
12	27	SGLVPRGSHNGSIYGD	14	1615.78	5	1622.23	0.373172	5.591337	0.374102	5.803	0.006
12	28	SGLVPRGSHNGSIYGD	15	1728.87	0	1730.26	0.077922	0	0	6.895	0.011
12	28	SGLVPRGSHNGSIYGD	15	1728.87	0.25	1735.002	0.217462	4.741851	0.231001	6.911	0.002
12	28	SGLVPRGSHNGSIYGD	15	1728.87	0.5	1735.524	0.041496	5.263768	0.088282	6.909	0.004
12	28	SGLVPRGSHNGSIYGD	15	1728.87	1	1735.668	0.069029	5.408431	0.1041	6.922	0.006
12	28	SGLVPRGSHNGSIYGD	15	1728.87	2	1735.604	0.118151	5.343885	0.141533	6.92	0.005
12	28	SGLVPRGSHNGSIYGD	15	1728.87	5	1735.555	0.070269	5.295153	0.104926	6.918	0.013
12	30	SGLVPRGSHNGSIYGD	17	1914.93	0	1916.217	0.139005	0	0	6.666	0.008
12	30	SGLVPRGSHNGSIYGD	17	1914.93	0.25	1922.004	0.348392	5.787157	0.375099	6.674	0.005
12	30	SGLVPRGSHNGSIYGD	17	1914.93	0.5	1922.65	0.198842	6.433899	0.242612	6.675	0.006
12	30	SGLVPRGSHNGSIYGD	17	1914.93	1	1922.669	0.231809	6.452544	0.270293	6.681	0.005
12	30	SGLVPRGSHNGSIYGD	17	1914.93	2	1922.606	0.132495	6.38904	0.192035	6.688	0.005
12	30	SGLVPRGSHNGSIYGD	17	1914.93	5	1922.594	0.024188	6.377644	0.141094	6.688	0.01
13	17	GLVPR	3	541.346	0	541.6143	0.012814	0	0	5.148	0.005
13	17	GLVPR	3	541.346	0.25	543.2097	0.00983	1.595374	0.01615	5.153	0.005
13	17	GLVPR	3	541.346	0.5	543.2289	0.009102	1.614624	0.015717	5.145	0.005
13	17	GLVPR	3	541.346	1	543.1718	0.027582	1.557521	0.030413	5.16	0.002
13	17	GLVPR	3	541.346	2	543.1135	0.014041	1.499226	0.019009	5.155	0.003
13	17	GLVPR	3	541.346	5	543.1151	0.008359	1.500829	0.015299	5.147	0.004
13	18	GLVPRG	4	598.367	0	598.7757	0.056909	0	0	5.249	0.009
13	18	GLVPRG	4	598.367	0.25	601.01	0.023206	2.234349	0.061459	5.26	0.005
13	18	GLVPRG	4	598.367	0.5	600.9403	0.062061	2.16464	0.084204	5.255	0.006
13	18	GLVPRG	4	598.367	1	600.983	0.029715	2.20738	0.0642	5.259	0.004
13	18	GLVPRG	4	598.367	2	600.8748	0.027191	2.099094	0.063071	5.257	0.005
13	18	GLVPRG	4	598.367	5	600.8598	0.017475	2.08416	0.059532	5.256	0.005
13	28	GLVPRGSHNGSIYGD	14	1641.83	0	1643.034	0.113057	0	0	6.931	0.008
13	28	GLVPRGSHNGSIYGD	14	1641.83	0.25	1647.621	0.168974	4.58653	0.203308	6.945	0.002
13	28	GLVPRGSHNGSIYGD	14	1641.83	0.5	1648.078	0.027965	5.043908	0.116464	6.942	0.006
13	28	GLVPRGSHNGSIYGD	14	1641.83	1	1648.357	0.020743	5.323126	0.114944	6.95	0.004
13	28	GLVPRGSHNGSIYGD	14	1641.83	2	1648.275	0.053479	5.240607	0.125067	6.954	0.002
13	28	GLVPRGSHNGSIYGD	14	1641.83	5	1648.262	0.103153	5.22758	0.153044	6.954	0.009
13	30	GLVPRGSHNGSIYGD	16	1827.9	0	1828.949	0.077564	0	0	6.695	0.011
13	30	GLVPRGSHNGSIYGD	16	1827.9	0.25	1834.623	0.337056	5.674139	0.345866	6.706	0.003
13	30	GLVPRGSHNGSIYGD	16	1827.9	0.5	1835.166	0.052656	6.21714	0.093748	6.709	1E-03
13	30	GLVPRGSHNGSIYGD	16	1827.9	1	1835.355	0.012853	6.405397	0.078622	6.714	0.008
13	30	GLVPRGSHNGSIYGD	16	1827.9	2	1835.265	0.055658	6.315533	0.095467	6.714	0.001
13	30	GLVPRGSHNGSIYGD	16	1827.9	5	1835.385	0.059124	6.435611	0.097528	6.72	0.003
14	18	LVPRG	3	541.346	0	541.6533	0.01907	0	0	5.215	0.009
14	18	LVPRG	3	541.346	0.25	543.6058	0.017013	1.95253	0.025556	5.232	0.004
14	18	LVPRG	3	541.346	0.5	543.5642	0.036572	1.910897	0.041245	5.213	0.018

Start	Ende	Sequenz	MaxUptake	MHP	Exposure	Center	Center SD	Uptake	Uptake SD	RT	RT SD
14	18	LVPRG	3	541.346	1	543.5668	0.011477	1.913543	0.022257	5.229	0.003
14	18	LVPRG	3	541.346	2	543.4851	0.017972	1.831796	0.026204	5.228	0.011
14	18	LVPRG	3	541.346	5	543.4204	0.041959	1.767143	0.046089	5.209	0.012
14	30	LVPRGSHNGSIYDGLAD	15	1770.88	0	1772.013	0.090726	0	0	6.37	0.006
14	30	LVPRGSHNGSIYDGLAD	15	1770.88	0.25	1770.779	0.285645	4.765735	0.299707	6.377	0.003
14	30	LVPRGSHNGSIYDGLAD	15	1770.88	0.5	1777.345	0.055217	5.332018	0.106208	6.374	0.004
14	30	LVPRGSHNGSIYDGLAD	15	1770.88	2	1777.527	0.137899	5.513658	0.165068	6.379	0.003
14	30	LVPRGSHNGSIYDGLAD	15	1770.88	5	1777.485	0.124905	5.472072	0.154378	6.381	0.004
16	28	PRGSHNGSIYDGL	11	1372.66	0	1373.456	0.054038	0	0	6.609	0.006
16	28	PRGSHNGSIYDGL	11	1372.66	0.25	1376.98	0.054894	3.523427	0.077029	6.613	7E-04
16	28	PRGSHNGSIYDGL	11	1372.66	0.5	1377.453	0.05811	3.996459	0.079353	6.612	0.004
16	28	PRGSHNGSIYDGL	11	1372.66	1	1377.656	0.093091	4.200065	0.107638	6.616	0.001
16	28	PRGSHNGSIYDGL	11	1372.66	2	1377.652	0.06165	4.19556	0.081981	6.617	9E-04
16	28	PRGSHNGSIYDGL	11	1372.66	5	1377.668	0.017911	4.211924	0.056929	6.617	0.007
18	28	GSHNGSIYDGL	10	1119.51	0	1120.301	0.079555	0	0	6.987	0.007
18	28	GSHNGSIYDGL	10	1119.51	0.25	1123.272	0.07845	2.971747	0.111729	6.998	0.003
18	28	GSHNGSIYDGL	10	1119.51	0.5	1123.517	0.020105	3.216359	0.082056	6.996	0.007
18	28	GSHNGSIYDGL	10	1119.51	1	1123.612	0.022264	3.310844	0.082611	6.997	9E-04
18	28	GSHNGSIYDGL	10	1119.51	2	1123.52	0.028535	3.219004	0.084518	6.995	0.003
18	28	GSHNGSIYDGL	10	1119.51	5	1123.486	0.034322	3.18526	0.086643	6.996	0.004
19	25	SHNGSIY	6	777.353	0	777.739	0.016326	0	0	5.329	0.008
19	25	SHNGSIY	6	777.353	0.25	780.1229	0.063963	2.383942	0.066014	5.341	0.004
19	25	SHNGSIY	6	777.353	0.5	780.112	0.086587	2.373026	0.088112	5.338	0.004
19	25	SHNGSIY	6	777.353	1	780.0918	0.093819	2.352824	0.095229	5.34	0.005
19	25	SHNGSIY	6	777.353	2	779.9691	0.096008	2.230067	0.097386	5.342	0.006
19	25	SHNGSIY	6	777.353	5	779.9452	0.1493	2.206179	0.15019	5.34	0.006
19	28	SHNGSIYDGL	9	1062.49	0	1063.348	0.159768	0	0	7.006	0.01
19	28	SHNGSIYDGL	9	1062.49	0.25	1066.467	0.108091	3.119312	0.192898	7.016	0.003
19	28	SHNGSIYDGL	9	1062.49	0.5	1066.606	0.015986	3.257799	0.160566	7.014	0.007
19	28	SHNGSIYDGL	9	1062.49	1	1066.627	0.053981	3.279471	0.168641	7.017	0.001
19	28	SHNGSIYDGL	9	1062.49	2	1066.508	0.021827	3.160426	0.161252	7.016	0.003
19	28	SHNGSIYDGL	9	1062.49	5	1066.461	0.020809	3.113199	0.161118	7.016	0.004
19	30	SHNGSIYDGLAD	11	1248.55	0	1249.195	0.042639	0	0	6.682	0.007
19	30	SHNGSIYDGLAD	11	1248.55	0.25	1253.336	0.039942	4.14109	0.058425	6.695	2E-04
19	30	SHNGSIYDGLAD	11	1248.55	0.5	1253.653	0.042889	4.457258	0.060478	6.679	0.001
19	30	SHNGSIYDGLAD	11	1248.55	1	1253.675	0.036571	4.47962	0.056174	6.696	6E-04
19	30	SHNGSIYDGLAD	11	1248.55	2	1253.535	0.020343	4.33958	0.047244	6.696	0.002
19	30	SHNGSIYDGLAD	11	1248.55	5	1253.53	0.041681	4.334868	0.059627	6.692	0.009
22	28	GSYDGL	6	724.351	0	724.903	0.003073	0	0	7.782	0.03
22	28	GSYDGL	6	724.351	0.25	728.0138	0.035022	3.110872	0.035157	7.786	0.003
22	28	GSYDGL	6	724.351	0.5	727.998	0.011122	3.094999	0.011538	7.784	0.006
22	28	GSYDGL	6	724.351	1	727.9805	0.026977	3.077538	0.027152	7.786	7E-04
22	28	GSYDGL	6	724.351	2	727.8509	0.011142	2.947879	0.011558	7.787	0.003
22	28	GSYDGL	6	724.351	5	727.8212	0.01324	2.918193	0.013592	7.784	0.004
22	30	GSYDGLAD	8	910.415	0	910.8751	0.020822	0	0	7.343	0.006
22	30	GSYDGLAD	8	910.415	0.25	915.289	0.076023	4.413912	0.078823	7.347	0.002
22	30	GSYDGLAD	8	910.415	0.5	915.3246	0.05445	4.449504	0.058295	7.338	0.003
22	30	GSYDGLAD	8	910.415	1	915.3115	0.003939	4.436361	0.021191	7.346	0.005
22	30	GSYDGLAD	8	910.415	2	915.0518	0	4.176628	0.020822	7.337	0
22	30	GSYDGLAD	8	910.415	5	915.0805	0.025201	4.205413	0.03269	7.342	0.007
23	28	SIYDGL	5	667.33	0	667.6844	0.012683	0	0	7.784	0.007
23	28	SIYDGL	5	667.33	0.25	670.2941	0.032326	2.609703	0.034725	7.788	0.003
23	28	SIYDGL	5	667.33	0.5	670.2862	0.011446	2.601821	0.017084	7.786	0.005
23	28	SIYDGL	5	667.33	1	670.2821	0.009042	2.597652	0.015576	7.788	0.001
23	28	SIYDGL	5	667.33	2	670.1811	0.009417	2.496662	0.015796	7.789	0.002
23	28	SIYDGL	5	667.33	5	670.1457	0.019877	2.461276	0.023578	7.786	0.004
23	30	SIYDGLAD	7	853.394	0	853.7851	0.030152	0	0	7.349	0.006
23	30	SIYDGLAD	7	853.394	0.25	857.5393	0.0408	3.754179	0.050733	7.36	0.002
23	30	SIYDGLAD	7	853.394	0.5	857.4917	0.054914	3.706615	0.062647	7.352	0.002
23	30	SIYDGLAD	7	853.394	1	857.5709	0.043143	3.785791	0.052636	7.359	0.002
23	30	SIYDGLAD	7	853.394	2	857.4071	0.021086	3.621969	0.036793	7.354	0.005
23	30	SIYDGLAD	7	853.394	5	857.4062	0.074047	3.621086	0.07995	7.351	0.007
26	31	GDLADF	5	637.283	0	637.5683	0.016683	0	0	7.792	0.008
26	31	GDLADF	5	637.283	0.25	639.9845	0.028451	2.416254	0.032981	7.801	0.004
26	31	GDLADF	5	637.283	0.5	639.9751	0.041223	2.406804	0.044471	7.799	0.004
26	31	GDLADF	5	637.283	1	639.9381	0.029029	2.369849	0.033482	7.801	7E-04
26	31	GDLADF	5	637.283	2	639.8694	0.013713	2.301071	0.021596	7.802	0.002
26	31	GDLADF	5	637.283	5	639.8675	0.023186	2.299204	0.028565	7.8	0.004
29	36	ADFSGPYE	6	885.363	0	885.9068	0.005807	0	0	6.903	0.004
29	36	ADFSGPYE	6	885.363	0.25	887.8897	0.143145	1.982912	0.143263	6.916	0.004
29	36	ADFSGPYE	6	885.363	0.5	887.9983	0.01461	2.09144	0.015722	6.912	0.009
29	36	ADFSGPYE	6	885.363	1	888.0243	0.024327	2.117519	0.025011	6.912	0.003
29	36	ADFSGPYE	6	885.363	2	887.9457	0.031979	2.038881	0.032502	6.911	0.005
29	36	ADFSGPYE	6	885.363	5	887.8904	0.016407	1.983618	0.017404	6.91	0.004
29	38	ADFSGPYEKF	8	1160.53	0	1161.567	0.12151	0	0	7.314	0.009
29	38	ADFSGPYEKF	8	1160.53	0.25	1162.292	0.146753	0.724861	0.190529	7.324	0.002
29	38	ADFSGPYEKF	8	1160.53	0.5	1162.412	0.104203	0.844617	0.160072	7.318	0.013
29	38	ADFSGPYEKF	8	1160.53	1	1162.47	0.128477	0.903325	0.176836	7.325	0.002
29	38	ADFSGPYEKF	8	1160.53	2	1162.529	0.191279	0.961481	0.226611	7.329	0.002
29	38	ADFSGPYEKF	8	1160.53	5	1162.482	0.106153	0.914615	0.161348	7.32	0.002
31	36	FSGPYE	4	699.298	0	699.7198	0.010696	0	0	6.491	0.004
31	36	FSGPYE	4	699.298	0.25	701.093	0.064668	1.373145	0.065547	6.506	0.004
31	36	FSGPYE	4	699.298	0.5	701.1639	0.009559	1.444101	0.014345	6.502	0.005
31	36	FSGPYE	4	699.298	1	701.1526	0.016126	1.432748	0.019351	6.503	0.002
31	36	FSGPYE	4	699.298	2	701.1165	0.0208	1.396712	0.023389	6.503	0.004
31	36	FSGPYE	4	699.298	5	701.0926	0.015683	1.372789	0.018984	6.503	0.003
31	38	FSGPYEKF	6	974.462	0	975.1196	0.043433	0	0	7.008	0.01
31	38	FSGPYEKF	6	974.462	0.25	975.6183	0.072357	0.498763	0.084392	7.023	0.003
31	38	FSGPYEKF	6	974.462	0.5	975.6811	0.040146	0.561557	0.059145	7.023	0.007
31	38	FSGPYEKF	6	974.462	1	975.7059	0.038867	0.586314	0.058284	7.025	0.002
31	38	FSGPYEKF	6	974.462	2	975.6992	0.051569	0.579612	0.067422	7.025	0.004
31	38	FSGPYEKF	6	974.462	5	975.6322	0.028471	0.512598	0.051932	7.025	0.004
32	38	SGPYEKF	5	827.393	0	828.032	0.098425	0	0	6.274	0.007
32	38	SGPYEKF	5	827.393	0.25	828.2184	0.126796	0.186464	0.160514	6.289	0.004
32	38	SGPYEKF	5	827.393	0.5	828.264	0.128177	0.232014	0.161607	6.285	0.006
32	38	SGPYEKF	5	827.393	1	828.2817	0.119247	0.249732	0.15462	6.285	0.004
32	38	SGPYEKF	5	827.393	2	828.268	0.121913	0.236031	0.156685	6.283	0.005
32	38	SGPYEKF	5	827.393	5	828.2603	0.130447	0.228397	0.163413	6.282	0.005

Start	Ende	Sequenz	MaxUptake	MHP	Exposure	Center	Center SD	Uptake	Uptake SD	RT	RT SD
32	52	SGPYEKFEDGTIPCGQFPSGQ	17	2243.99	0	2245.45	0.129409	0	0	6.958	0.007
32	52	SGPYEKFEDGTIPCGQFPSGQ	17	2243.99	0.25	2245.893	0.017409	0.442198	0.130575	6.971	0.002
32	52	SGPYEKFEDGTIPCGQFPSGQ	17	2243.99	0.5	2245.872	0.034341	0.422083	0.133888	6.975	0.005
32	52	SGPYEKFEDGTIPCGQFPSGQ	17	2243.99	1	2245.942	0.016955	0.491348	0.130515	6.972	0.003
32	52	SGPYEKFEDGTIPCGQFPSGQ	17	2243.99	2	2245.895	0.019362	0.44428	0.13085	6.97	0.005
32	52	SGPYEKFEDGTIPCGQFPSGQ	17	2243.99	5	2245.9	0.010422	0.449537	0.129828	6.967	0.006
34	38	PYEKF	3	683.34	0	683.6864	0.026206	0	0	6.27	0.004
34	38	PYEKF	3	683.34	0.25	683.8094	0.028554	0.123072	0.038757	6.286	0.005
34	38	PYEKF	3	683.34	0.5	683.8569	0.022109	0.17052	0.034287	6.284	0.007
34	38	PYEKF	3	683.34	1	683.8491	0.001917	0.162729	0.026276	6.285	0.007
34	38	PYEKF	3	683.34	2	683.8269	0.026001	0.140558	0.036916	6.29	0.002
34	38	PYEKF	3	683.34	5	683.8387	0.014108	0.152287	0.029762	6.29	0.003
37	48	KFEDGTIPCGQF	10	1341.61	0	1342.436	0.025305	0	0	7.428	0.008
37	48	KFEDGTIPCGQF	10	1341.61	0.25	1343.103	0.064538	0.667083	0.069322	7.442	0.002
37	48	KFEDGTIPCGQF	10	1341.61	0.5	1343.201	0.035631	0.764711	0.043702	7.439	0.005
37	48	KFEDGTIPCGQF	10	1341.61	1	1343.167	0.011118	0.730401	0.027639	7.442	0.002
37	48	KFEDGTIPCGQF	10	1341.61	2	1343.201	0.022269	0.764439	0.033708	7.443	0.002
37	48	KFEDGTIPCGQF	10	1341.61	5	1343.134	0	0.698167	0.025305	7.447	0
39	48	EDGTIPCGQF	8	1066.45	0	1067.017	0.058335	0	0	7.576	0.007
39	48	EDGTIPCGQF	8	1066.45	0.25	1067.14	0.075936	0.122919	0.095756	7.584	0.009
39	48	EDGTIPCGQF	8	1066.45	0.5	1067.166	0.082788	0.148921	0.101276	7.585	0.006
39	48	EDGTIPCGQF	8	1066.45	1	1067.156	0.098761	0.139213	0.114702	7.587	0.004
39	48	EDGTIPCGQF	8	1066.45	2	1067.153	0.080691	0.135726	0.099569	7.587	0.003
39	48	EDGTIPCGQF	8	1066.45	5	1067.146	0.057697	0.129381	0.082048	7.585	0.002
49	59	PSGQGVIPISW	8	1140.6	0	1141.349	0.144495	0	0	8.617	0.007
49	59	PSGQGVIPISW	8	1140.6	0.25	1141.569	0.155955	0.220286	0.212605	8.624	0.003
49	59	PSGQGVIPISW	8	1140.6	0.5	1141.847	0.043647	0.497717	0.150943	8.62	0.007
49	59	PSGQGVIPISW	8	1140.6	1	1141.841	0.039438	0.491878	0.14978	8.624	0.003
49	59	PSGQGVIPISW	8	1140.6	2	1141.845	0.016018	0.495519	0.14538	8.624	0.003
49	59	PSGQGVIPISW	8	1140.6	5	1141.79	0.027738	0.440876	0.147133	8.617	0.008
49	60	PSGQGVIPISWL	9	1253.69	0	1254.661	0.225989	0	0	9.387	0.008
49	60	PSGQGVIPISWL	9	1253.69	0.25	1254.714	0.19841	0.052706	0.300728	9.401	0.002
49	60	PSGQGVIPISWL	9	1253.69	0.5	1255.074	0.028797	0.41282	0.227816	9.396	0.005
49	60	PSGQGVIPISWL	9	1253.69	1	1255.178	0.027742	0.517035	0.227685	9.402	0.001
49	60	PSGQGVIPISWL	9	1253.69	2	1255.196	0.04301	0.53519	0.230045	9.404	0.003
49	60	PSGQGVIPISWL	9	1253.69	5	1255.131	0.034605	0.470002	0.228623	9.394	0.014
53	59	GVIPISW	5	771.44	0	771.9922	0.096814	0	0	8.842	0.007
53	59	GVIPISW	5	771.44	0.25	772.3963	0.145799	0.404108	0.175015	8.856	0.004
53	59	GVIPISW	5	771.44	0.5	772.5876	0.031138	0.595365	0.101698	8.851	0.006
53	59	GVIPISW	5	771.44	1	772.6348	0.004344	0.642624	0.096911	8.859	0.003
53	59	GVIPISW	5	771.44	2	772.632	0.020182	0.639763	0.098895	8.858	0.003
53	59	GVIPISW	5	771.44	5	772.5495	0.016852	0.557311	0.098269	8.848	0.011
53	60	GVIPISWL	6	884.524	0	885.2324	0.229793	0	0	9.642	0.007
53	60	GVIPISWL	6	884.524	0.25	885.4676	0.277604	0.235164	0.360373	9.656	0.003
53	60	GVIPISWL	6	884.524	0.5	885.8964	0.027969	0.664005	0.231489	9.65	0.006
53	60	GVIPISWL	6	884.524	1	885.9645	0.027879	0.732018	0.231478	9.657	9E-04
53	60	GVIPISWL	6	884.524	2	885.9741	0.042047	0.741645	0.233608	9.658	0.004
53	60	GVIPISWL	6	884.524	5	885.9039	0.021824	0.671463	0.230827	9.646	0.017
54	58	VIPIISW	3	528.339	0	528.6906	0.014145	0	0	5.986	0.009
54	58	VIPIISW	3	528.339	0.25	530.2794	0.013709	1.588885	0.019698	5.99	0.006
54	58	VIPIISW	3	528.339	0.5	530.2605	0.00386	1.569928	0.014662	5.985	0.009
54	58	VIPIISW	3	528.339	1	530.2562	0.010612	1.565644	0.017684	5.996	0.006
54	58	VIPIISW	3	528.339	2	530.1927	0.007602	1.502148	0.016059	5.994	0.003
54	58	VIPIISW	3	528.339	5	530.1834	0.00637	1.492808	0.015514	5.99	0.008
54	59	VIPIISW	4	714.419	0	714.861	0.007598	0	0	8.586	0.007
54	59	VIPIISW	4	714.419	0.25	717.1261	0.062664	2.265053	0.063123	8.591	0.002
54	59	VIPIISW	4	714.419	0.5	717.1209	0.034771	2.259922	0.035591	8.588	0.006
54	59	VIPIISW	4	714.419	1	717.0935	0.023599	2.232491	0.024792	8.591	0.003
54	59	VIPIISW	4	714.419	2	716.9904	0.007736	2.129407	0.010844	8.591	0.003
54	59	VIPIISW	4	714.419	5	716.9947	0.01842	2.13367	0.019926	8.584	0.009
54	60	VIPIISWL	5	827.503	0	827.9578	0.022284	0	0	9.464	0.006
54	60	VIPIISWL	5	827.503	0.25	831.0146	0.205856	3.056784	0.207059	9.476	0.005
54	60	VIPIISWL	5	827.503	0.5	831.0006	0.187539	3.042783	0.188859	9.471	0.006
54	60	VIPIISWL	5	827.503	1	830.9848	0.236594	3.027032	0.237641	9.478	0.003
54	60	VIPIISWL	5	827.503	2	830.8416	0.242315	2.883872	0.243337	9.476	0.002
54	60	VIPIISWL	5	827.503	5	830.8047	0.239872	2.846901	0.240905	9.464	0.013
58	71	SWLDEGGWSGVENT	13	1536.66	0	1537.472	0.042188	0	0	8.681	0.006
58	71	SWLDEGGWSGVENT	13	1536.66	0.25	1543.206	0.151816	5.733624	0.157569	8.698	0.001
58	71	SWLDEGGWSGVENT	13	1536.66	0.5	1543.191	0	5.718973	0.042188	8.701	0
58	71	SWLDEGGWSGVENT	13	1536.66	1	1543.24	0.07283	5.767675	0.084167	8.699	0.001
58	71	SWLDEGGWSGVENT	13	1536.66	2	1543.099	0.139961	5.627136	0.146181	8.698	1E-03
58	71	SWLDEGGWSGVENT	13	1536.66	5	1543.246	0.296568	5.774323	0.299554	8.689	0.008
60	65	LDEGGW	5	676.294	0	676.6077	0.017898	0	0	7.599	0.006
60	65	LDEGGW	5	676.294	0.25	677.7459	0.038916	1.138183	0.042834	7.615	0.007
60	65	LDEGGW	5	676.294	0.5	677.8147	0.010622	1.207009	0.020813	7.608	0.005
60	65	LDEGGW	5	676.294	1	677.8309	0.009338	1.223223	0.020187	7.611	0.002
60	65	LDEGGW	5	676.294	2	677.8144	0.023698	1.206677	0.029698	7.61	0.001
60	65	LDEGGW	5	676.294	5	677.8157	0.015882	1.208024	0.023929	7.608	0.005
60	67	LDEGGWSG	7	820.347	0	820.7621	0.007534	0	0	6.868	0.005
60	67	LDEGGWSG	7	820.347	0.25	822.4423	0.09289	1.680183	0.093195	6.881	0.004
60	67	LDEGGWSG	7	820.347	0.5	822.4839	0.026361	1.721745	0.027417	6.878	0.008
60	67	LDEGGWSG	7	820.347	1	822.5516	0.066603	1.789466	0.067028	6.878	0.002
60	67	LDEGGWSG	7	820.347	2	822.5338	0.06175	1.771709	0.062208	6.877	0.004
60	67	LDEGGWSG	7	820.347	5	822.5946	0.027006	1.832504	0.028037	6.877	0.004
60	69	LDEGGWSGVE	9	1048.46	0	1048.996	0.028018	0	0	7.392	0.007
60	69	LDEGGWSGVE	9	1048.46	0.25	1051.689	0.173186	2.692783	0.175438	7.404	0.002
60	69	LDEGGWSGVE	9	1048.46	0.5	1051.83	0.006921	2.833886	0.02886	7.395	0.004
60	69	LDEGGWSGVE	9	1048.46	1	1051.939	0.051441	2.942788	0.058576	7.402	0.003
60	69	LDEGGWSGVE	9	1048.46	2	1051.884	0.073307	2.887201	0.078479	7.4	0.003
60	69	LDEGGWSGVE	9	1048.46	5	1051.939	0.028827	2.942755	0.0402	7.396	0.005
60	71	LDEGGWSGVENT	11	1263.55	0	1264.521	0.176495	0	0	7.147	0.007
60	71	LDEGGWSGVENT	11	1263.55	0.25	1267.581	0.268706	3.059804	0.321487	7.158	0.002
60	71	LDEGGWSGVENT	11	1263.55	0.5	1267.679	0.246725	3.157716	0.303355	7.153	0.004
60	71	LDEGGWSGVENT	11	1263.55	1	1267.812	0.295958	3.291484	0.344589	7.156	0.002
60	71	LDEGGWSGVENT	11	1263.55	2	1267.838	0.249019	3.317286	0.305223	7.153	0.001
60	71	LDEGGWSGVENT	11	1263.55	5	1267.786	0.2341	3.265502	0.293178	7.151	0.006
60	72	LDEGGWSGVENTD	12	1378.58	0	1379.298	0.031307	0	0	7.131	0.008

Start	Ende	Sequenz	MaxUptake	MHP	Exposure	Center	Center SD	Uptake	Uptake SD	RT	RT SD
60	72	LDEGGWSGVENTD	12	1378.58	0.25	1382.815	0.228732	3.516405	0.023065	7.142	0.001
60	72	LDEGGWSGVENTD	12	1378.58	0.5	1383.04	0.251542	3.741719	0.025343	7.138	0.003
60	72	LDEGGWSGVENTD	12	1378.58	1	1383.095	0.243829	3.796953	0.024503	7.141	0.002
60	72	LDEGGWSGVENTD	12	1378.58	2	1383.202	0.129667	3.903842	0.073393	7.138	9E-04
60	72	LDEGGWSGVENTD	12	1378.58	5	1383.224	0.172759	3.925881	0.175573	7.135	0.006
60	79	LDEGGWSGVENTDTSTGGSC	19	1971.79	0	1972.892	0.098362	0	0	7.142	0.008
60	79	LDEGGWSGVENTDTSTGGSC	19	1971.79	0.25	1978.148	0	5.255268	0.098362	7.147	0
60	79	LDEGGWSGVENTDTSTGGSC	19	1971.79	0.5	1978.252	0.203473	5.359886	0.226	7.154	0.002
60	79	LDEGGWSGVENTDTSTGGSC	19	1971.79	1	1978.369	0	5.47679	0.098362	7.159	0
60	79	LDEGGWSGVENTDTSTGGSC	19	1971.79	2	1978.051	0	5.15844	0.098362	7.161	0
60	79	LDEGGWSGVENTDTSTGGSC	19	1971.79	5	1978	2.27E-13	5.107314	0.098362	7.147	0
60	84	LDEGGWSGVENTDTSTGGSCKEGSY	24	2536.04	0	2537.533	0.051766	0	0	6.847	0.008
60	84	LDEGGWSGVENTDTSTGGSCKEGSY	24	2536.04	0.25	2544.507	1.073973	6.97362	1.07522	6.859	0.005
60	84	LDEGGWSGVENTDTSTGGSCKEGSY	24	2536.04	0.5	2544.598	0.975424	7.064714	0.976796	6.855	0.008
60	84	LDEGGWSGVENTDTSTGGSCKEGSY	24	2536.04	1	2544.947	0.935174	7.413996	0.936606	6.858	0.006
60	84	LDEGGWSGVENTDTSTGGSCKEGSY	24	2536.04	2	2544.929	0.876575	7.395452	0.878103	6.855	0.007
60	84	LDEGGWSGVENTDTSTGGSCKEGSY	24	2536.04	5	2544.934	0.745562	7.40062	0.747357	6.854	0.008
61	69	DEGGWSGVE	8	935.374	0	935.8714	0.028479	0	0	7.149	0.007
61	69	DEGGWSGVE	8	935.374	0.25	938.2993	0.158668	2.427852	0.161203	7.16	0.003
61	69	DEGGWSGVE	8	935.374	0.5	938.4235	0.030383	2.552099	0.041643	7.153	0.008
61	69	DEGGWSGVE	8	935.374	1	938.525	0.019894	2.653621	0.034739	7.155	0.003
61	69	DEGGWSGVE	8	935.374	2	938.4786	0.036655	2.607232	0.046418	7.152	0.004
61	69	DEGGWSGVE	8	935.374	5	938.517	0.046077	2.645621	0.054167	7.153	0.003
61	71	DEGGWSGVENT	10	1150.46	0	1151.287	0.071915	0	0	6.897	0.006
61	71	DEGGWSGVENT	10	1150.46	0.25	1154.206	0.277973	2.919637	0.287125	6.908	0.004
61	71	DEGGWSGVENT	10	1150.46	0.5	1154.253	0.275439	2.966637	0.284673	6.902	0.006
61	71	DEGGWSGVENT	10	1150.46	1	1154.365	0.287049	3.077766	0.29592	6.904	0.002
61	71	DEGGWSGVENT	10	1150.46	2	1154.281	0.284036	2.994529	0.292999	6.901	0.002
61	71	DEGGWSGVENT	10	1150.46	5	1154.29	0.272337	3.00332	0.281672	6.902	0.005
61	72	DEGGWSGVENTD	11	1265.49	0	1266.092	0.119265	0	0	6.876	0.007
61	72	DEGGWSGVENTD	11	1265.49	0.25	1269.397	0.358497	3.304617	0.377815	6.885	0.003
61	72	DEGGWSGVENTD	11	1265.49	0.5	1269.616	0.19803	3.524115	0.231171	6.882	2E-04
61	72	DEGGWSGVENTD	11	1265.49	1	1269.697	0.337622	3.604603	0.358068	6.884	0.002
61	72	DEGGWSGVENTD	11	1265.49	2	1269.604	0.211589	3.512545	0.242887	6.88	0.002
61	72	DEGGWSGVENTD	11	1265.49	5	1269.591	0.340433	3.499351	0.36072	6.874	0.002
61	73	DEGGWSGVENTDT	12	1366.54	0	1367.197	0.057193	0	0	6.885	0.007
61	73	DEGGWSGVENTDT	12	1366.54	0.25	1370.639	0.499203	3.441981	0.502469	6.894	0.003
61	73	DEGGWSGVENTDT	12	1366.54	0.5	1371.029	0.447845	3.831544	0.451483	6.889	0.004
61	73	DEGGWSGVENTDT	12	1366.54	1	1371.049	0.306633	3.85197	0.311922	6.893	0.001
61	73	DEGGWSGVENTDT	12	1366.54	2	1370.56	0.382579	3.362904	0.38683	6.89	6E-04
61	73	DEGGWSGVENTDT	12	1366.54	5	1370.927	0.35737	3.73025	0.361918	6.891	0.006
61	84	DEGGWSGVENTDTSTGGSCKEGSY	23	2422.96	0	2424.333	0.03357	0	0	6.692	0.008
61	84	DEGGWSGVENTDTSTGGSCKEGSY	23	2422.96	0.25	2430.605	0.904124	6.27124	0.904747	6.71	0.006
61	84	DEGGWSGVENTDTSTGGSCKEGSY	23	2422.96	0.5	2431.396	0.749275	7.062378	0.750027	6.711	0.005
61	84	DEGGWSGVENTDTSTGGSCKEGSY	23	2422.96	1	2431.958	0.179501	7.624884	0.182613	6.711	0.005
61	84	DEGGWSGVENTDTSTGGSCKEGSY	23	2422.96	2	2431.451	0.55432	7.11729	0.555336	6.708	0.002
61	84	DEGGWSGVENTDTSTGGSCKEGSY	23	2422.96	5	2431.176	0.765926	6.842988	0.766661	6.705	0.011
65	71	WSGVENT	6	792.352	0	792.7397	0.032054	0	0	6.191	0.006
65	71	WSGVENT	6	792.352	0.25	794.6586	0.168549	1.918929	0.17157	6.206	0.002
65	71	WSGVENT	6	792.352	0.5	794.6883	0.034341	1.948597	0.046976	6.204	3E-04
65	71	WSGVENT	6	792.352	1	794.8413	0.026987	2.10156	0.041902	6.202	0.001
65	71	WSGVENT	6	792.352	2	794.7454	0.02745	2.005684	0.042202	6.196	0.001
65	71	WSGVENT	6	792.352	5	794.7509	0	2.011206	0.032054	6.197	0
70	84	NTDTSTGGSCKEGSY	14	1506.6	0	1507.399	0.029563	0	0	4.94	0.007
70	84	NTDTSTGGSCKEGSY	14	1506.6	0.25	1509.838	0.230644	2.439776	0.232531	4.95	0.004
70	84	NTDTSTGGSCKEGSY	14	1506.6	0.5	1509.773	0.037149	2.374343	0.047476	4.948	0.003
70	84	NTDTSTGGSCKEGSY	14	1506.6	1	1509.885	0.039564	2.485912	0.04939	4.95	0.002
70	84	NTDTSTGGSCKEGSY	14	1506.6	2	1509.858	0.091635	2.45895	0.096286	4.949	6E-04
70	84	NTDTSTGGSCKEGSY	14	1506.6	5	1509.819	0.063554	2.420073	0.070093	4.947	0.006
72	84	DTSTGGSCKEGSY	12	1291.51	0	1292.384	0.066058	0	0	4.977	0.007
72	84	DTSTGGSCKEGSY	12	1291.51	0.25	1294.921	0.19171	2.537545	0.202772	4.991	0.003
72	84	DTSTGGSCKEGSY	12	1291.51	0.5	1294.909	0.065374	2.525259	0.092938	4.986	0.004
72	84	DTSTGGSCKEGSY	12	1291.51	1	1294.945	0.166902	2.561977	0.179499	4.991	0.001
72	84	DTSTGGSCKEGSY	12	1291.51	2	1294.99	0.122413	2.606068	0.130909	4.991	0.002
72	84	DTSTGGSCKEGSY	12	1291.51	5	1294.894	0.063694	2.510314	0.091764	4.989	0.006
94	106	SKTQWPSDQPSDG	10	1432.63	0	1433.478	0.067808	0	0	5.648	0.009
94	106	SKTQWPSDQPSDG	10	1432.63	0.25	1433.97	0.101628	0.491753	0.122173	5.661	0.002
94	106	SKTQWPSDQPSDG	10	1432.63	0.5	1433.981	0.075235	0.503175	0.101283	5.656	0.003
94	106	SKTQWPSDQPSDG	10	1432.63	1	1434.01	0.064128	0.531952	0.093329	5.663	0.001
94	106	SKTQWPSDQPSDG	10	1432.63	2	1433.976	0.062797	0.498178	0.09242	5.657	0.003
94	106	SKTQWPSDQPSDG	10	1432.63	5	1433.944	0.077855	0.466009	0.103244	5.653	0.004
94	108	SKTQWPSDQPSDGRS	12	1675.77	0	1676.696	0.055944	0	0	5.252	0.007
94	108	SKTQWPSDQPSDGRS	12	1675.77	0.25	1677.244	0.123281	0.54832	0.135381	5.268	0.006
94	108	SKTQWPSDQPSDGRS	12	1675.77	0.5	1677.258	0.080255	0.561848	0.09783	5.261	0.005
94	108	SKTQWPSDQPSDGRS	12	1675.77	1	1677.316	0.061275	0.620328	0.082972	5.272	0.008
94	108	SKTQWPSDQPSDGRS	12	1675.77	2	1677.288	0.063404	0.592346	0.084557	5.271	0.007
94	108	SKTQWPSDQPSDGRS	12	1675.77	5	1677.262	0.061848	0.566082	0.083396	5.269	0.006
94	112	SKTQWPSDQPSDGRSIGGL	16	2015.98	0	2017.362	0.164599	0	0	6.6	0.007
94	112	SKTQWPSDQPSDGRSIGGL	16	2015.98	0.25	2017.975	0.167685	0.613603	0.23497	6.607	0.003
94	112	SKTQWPSDQPSDGRSIGGL	16	2015.98	0.5	2018.092	0.106388	0.730705	0.195988	6.606	0.006
94	112	SKTQWPSDQPSDGRSIGGL	16	2015.98	1	2018.118	0.090322	0.756245	0.187752	6.609	0.003
94	112	SKTQWPSDQPSDGRSIGGL	16	2015.98	2	2018.144	0.095925	0.782403	0.190511	6.607	0.001
94	112	SKTQWPSDQPSDGRSIGGL	16	2015.98	5	2018.171	0.106618	0.809699	0.196112	6.614	0.004
94	113	SKTQWPSDQPSDGRSIGGLL	17	2129.06	0	2130.322	0.153509	0	0	7.305	0.007
94	113	SKTQWPSDQPSDGRSIGGLL	17	2129.06	0.5	2130.776	0.081214	0.454665	0.173669	7.331	0.003
94	113	SKTQWPSDQPSDGRSIGGLL	17	2129.06	5	2130.961	0.042908	0.639489	0.159393	7.333	0.002
95	106	KTQWPSDQPSDG	9	1345.6	0	1346.42	0.035331	0	0	5.657	0.009
95	106	KTQWPSDQPSDG	9	1345.6	0.25	1346.838	0.079764	0.418372	0.087238	5.671	0.002
95	106	KTQWPSDQPSDG	9	1345.6	0.5	1346.846	0.023531	0.426088	0.04245	5.666	0.004
95	106	KTQWPSDQPSDG	9	1345.6	1	1346.896	0.003934	0.475508	0.035549	5.673	3E-04
95	106	KTQWPSDQPSDG	9	1345.6	2	1346.886	0.028245	0.465801	0.045233	5.669	0.003
95	106	KTQWPSDQPSDG	9	1345.6	5	1346.845	0.0427	0.425378	0.055421	5.669	6E-04
95	108	KTQWPSDQPSDGRS	11	1588.74	0	1589.623	0.085317	0	0	5.265	0.009
95	108	KTQWPSDQPSDGRS	11	1588.74	0.25	1590.102	0.093268	0.478685	0.126404	5.28	0.009
95	108	KTQWPSDQPSDGRS	11	1588.74	0.5	1590.165	0.052258	0.54222	0.10005	5.276	0.008
95	108	KTQWPSDQPSDGRS	11	1588.74	1	1590.167	0.116477	0.543926	0.144381	5.289	0.009
95	108	KTQWPSDQPSDGRS	11	1588.74	2	1590.159	0.17159	0.535964	0.191631		

Start	Ende	Sequenz	MaxUptake	MHP	Exposure	Center	Center SD	Uptake	Uptake SD	RT	RT SD
95	108	KTQWPSDQPSDGRS	11	1588.74	5	1590.156	0.173423	0.533008	0.193273	5.288	0.01
95	113	KTQWPSDQPSDGRSIGGLL	16	2042.03	0	2043.21	0.095193	0	0	7.336	0.005
95	113	KTQWPSDQPSDGRSIGGLL	16	2042.03	0.25	2043.989	0.07265	0.778538	0.119749	7.367	0.002
95	113	KTQWPSDQPSDGRSIGGLL	16	2042.03	0.5	2043.888	0.075644	0.677526	0.121588	7.366	0.003
95	113	KTQWPSDQPSDGRSIGGLL	16	2042.03	1	2044.075	0.012305	0.864353	0.095985	7.372	0.001
95	113	KTQWPSDQPSDGRSIGGLL	16	2042.03	2	2044.008	0.066414	0.798086	0.116071	7.375	0.005
95	113	KTQWPSDQPSDGRSIGGLL	16	2042.03	5	2043.631	0.057781	0.420547	0.111357	7.387	0.004
96	111	TQWPSDQPSDGRSIGG	13	1687.77	0	1688.647	0.02406	0	0	6.129	0.006
96	111	TQWPSDQPSDGRSIGG	13	1687.77	0.25	1695.374	0.075882	6.726751	0.079605	6.141	0.005
96	111	TQWPSDQPSDGRSIGG	13	1687.77	0.5	1695.272	0.130604	6.624265	0.132802	6.137	0.006
96	111	TQWPSDQPSDGRSIGG	13	1687.77	1	1695.211	0.08001	6.563411	0.083549	6.141	0.003
96	111	TQWPSDQPSDGRSIGG	13	1687.77	2	1694.86	0.106467	6.212822	0.109152	6.143	0.002
96	111	TQWPSDQPSDGRSIGG	13	1687.77	5	1694.635	0.070439	5.987848	0.074435	6.145	0.002
97	111	QWPSDQPSDGRSIGG	12	1586.72	0	1587.557	0.027365	0	0	6.144	0.007
97	111	QWPSDQPSDGRSIGG	12	1586.72	0.25	1593.657	0	6.099923	0.027365	6.16	0
97	111	QWPSDQPSDGRSIGG	12	1586.72	0.5	1593.605	0.035627	6.047999	0.044924	6.158	0.002
97	111	QWPSDQPSDGRSIGG	12	1586.72	1	1593.505	0.014819	5.948147	0.03112	6.158	0.001
97	111	QWPSDQPSDGRSIGG	12	1586.72	2	1593.091	0.015341	5.534735	0.031372	6.161	0.001
97	111	QWPSDQPSDGRSIGG	12	1586.72	5	1592.936	0	5.379433	0.027365	6.156	0
120	128	YRSNTD TDY	8	1134.47	0	1135.326	0.13627	0	0	5.194	0.009
120	128	YRSNTD TDY	8	1134.47	0.25	1136.202	0.181134	0.8765	0.226669	5.207	0.004
120	128	YRSNTD TDY	8	1134.47	0.5	1136.22	0.140765	0.894069	0.195919	5.207	0.003
120	128	YRSNTD TDY	8	1134.47	1	1136.294	0.13187	0.968898	0.189629	5.207	0.001
120	128	YRSNTD TDY	8	1134.47	2	1136.274	0.147907	0.948893	0.201112	5.209	0.003
120	128	YRSNTD TDY	8	1134.47	5	1136.226	0.150501	0.900708	0.203027	5.215	0.007
127	131	DYLCE	4	642.244	0	642.5696	0.018042	0	0	7.065	0.005
127	131	DYLCE	4	642.244	0.25	642.7182	0.023095	0.148561	0.029307	7.077	0.002
127	131	DYLCE	4	642.244	0.5	642.7151	0.024922	0.14546	0.030767	7.071	0.004
127	131	DYLCE	4	642.244	1	642.7032	0.015373	0.133538	0.023703	7.073	0.002
127	131	DYLCE	4	642.244	2	642.722	0.003314	0.152325	0.018344	7.071	0.001
127	131	DYLCE	4	642.244	5	642.7154	0.012126	0.145743	0.021738	7.069	0.005
132	137	WGVDA	5	618.288	0	618.8141	0.007848	0	0	7.06	0.006
132	137	WGVDA	5	618.288	0.25	619.8905	0.062504	1.076415	0.062995	7.069	0.002
132	137	WGVDA	5	618.288	0.5	619.8615	0.033029	1.04739	0.033949	7.063	0.005
132	137	WGVDA	5	618.288	1	619.9075	0.024668	1.093452	0.025887	7.066	0.002
132	137	WGVDA	5	618.288	2	619.8753	0.040429	1.061178	0.041183	7.062	0.001
132	137	WGVDA	5	618.288	5	619.8399	0.040798	1.025851	0.041546	7.062	0.005
138	142	YVSE	4	596.293	0	596.781	0.017068	0	0	5.657	0.008
138	142	YVSE	4	596.293	0.25	597.7745	0.034052	0.993544	0.03809	5.667	0.003
138	142	YVSE	4	596.293	0.5	597.7612	0.026215	0.980208	0.031282	5.663	0.006
138	142	YVSE	4	596.293	1	597.7766	0.054726	0.99558	0.057326	5.664	9E-04
138	142	YVSE	4	596.293	2	597.6429	0.06081	0.861939	0.06316	5.663	0.001
138	142	YVSE	4	596.293	5	597.5504	0.01076	0.769458	0.020177	5.665	0.004
138	143	YVSEL	5	709.377	0	709.978	0.005696	0	0	7.448	0.008
138	143	YVSEL	5	709.377	0.25	711.4961	0.058443	1.518111	0.05872	7.457	0.002
138	143	YVSEL	5	709.377	0.5	711.4906	0.006299	1.512602	0.008492	7.45	0.007
138	143	YVSEL	5	709.377	1	711.4473	0.046381	1.469273	0.046729	7.458	0.002
138	143	YVSEL	5	709.377	2	711.3322	0.041035	1.354179	0.041428	7.455	0.003
138	143	YVSEL	5	709.377	5	711.2267	0.012694	1.248731	0.013914	7.452	0.002
138	146	YVSELSND	8	1025.48	0	1026.044	0.02925	0	0	6.666	0.006
138	146	YVSELSND	8	1025.48	0.25	1028.08	0.080535	2.036059	0.085682	6.674	0.004
138	146	YVSELSND	8	1025.48	0.5	1028.072	0.109552	2.028376	0.11339	6.672	0.007
138	146	YVSELSND	8	1025.48	1	1028.06	0.019893	2.016577	0.035374	6.675	0.002
138	146	YVSELSND	8	1025.48	2	1027.952	0.133035	1.908858	0.136212	6.675	0.004
138	146	YVSELSND	8	1025.48	5	1027.794	0.043546	1.750573	0.052458	6.674	0.005
139	143	VVSEL	4	546.313	0	546.8956	0.020294	0	0	6.408	0.008
139	143	VVSEL	4	546.313	0.25	547.9696	0.020217	1.073946	0.028646	6.422	0.003
139	143	VVSEL	4	546.313	0.5	547.9682	0.003769	1.072586	0.020642	6.417	0.004
139	143	VVSEL	4	546.313	1	547.9683	0.007107	1.07267	0.021503	6.418	0.002
139	143	VVSEL	4	546.313	2	547.8804	0.005198	0.984829	0.02095	6.416	0.003
139	143	VVSEL	4	546.313	5	547.8084	0.019214	0.912762	0.027947	6.414	0.005
139	144	VVSELS	5	633.345	0	633.616	0.008468	0	0	5.62	0.009
139	144	VVSELS	5	633.345	0.25	636.2993	0.051914	2.683319	0.0526	5.629	0.004
139	144	VVSELS	5	633.345	0.5	636.3397	0.038752	2.723692	0.039667	5.624	0.006
139	144	VVSELS	5	633.345	1	636.336	0.056693	2.72	0.057322	5.626	0.002
139	144	VVSELS	5	633.345	2	636.2306	0.020214	2.614645	0.021916	5.624	0.003
139	144	VVSELS	5	633.345	5	636.2234	0.051687	2.607379	0.052376	5.622	0.004
139	146	VVSELSND	7	862.415	0	862.9739	0.047761	0	0	5.619	0.007
139	146	VVSELSND	7	862.415	0.25	865.0018	0.226876	2.027913	0.231849	5.631	0.003
139	146	VVSELSND	7	862.415	0.5	865.0003	0.248754	2.026333	0.253298	5.625	0.005
139	146	VVSELSND	7	862.415	1	864.9796	0.237018	2.00569	0.241782	5.628	0.002
139	146	VVSELSND	7	862.415	2	864.839	0.264739	1.865043	0.269013	5.625	0.004
139	146	VVSELSND	7	862.415	5	864.7521	0.25658	1.778199	0.260987	5.623	0.003
147	159	VAICRTDYPGTEN	11	1438.66	0	1439.528	0.016601	0	0	5.875	0.009
147	159	VAICRTDYPGTEN	11	1438.66	0.25	1440.869	0.288432	1.340902	0.288909	5.889	0.002
147	159	VAICRTDYPGTEN	11	1438.66	0.5	1440.702	0.087611	1.174427	0.08917	5.883	0.004
147	159	VAICRTDYPGTEN	11	1438.66	1	1440.777	0.045854	1.249102	0.048767	5.889	0.003
147	159	VAICRTDYPGTEN	11	1438.66	2	1440.802	0.063623	1.274399	0.065753	5.887	0.002
147	159	VAICRTDYPGTEN	11	1438.66	5	1440.755	0.032193	1.226774	0.036221	5.887	0.003
147	160	VAICRTDYPGTENM	12	1569.7	0	1570.691	0.023097	0	0	6.555	0.011
147	160	VAICRTDYPGTENM	12	1569.7	0.25	1575.678	0.241285	4.987591	0.024388	6.561	0.001
147	160	VAICRTDYPGTENM	12	1569.7	0.5	1575.408	0.088256	4.917886	0.091228	6.561	0.003
147	160	VAICRTDYPGTENM	12	1569.7	1	1575.564	0.237543	4.873797	0.023663	6.564	0.004
147	160	VAICRTDYPGTENM	12	1569.7	2	1575.386	0.066464	4.695673	0.070362	6.562	0.001
147	160	VAICRTDYPGTENM	12	1569.7	5	1575.243	0.077876	4.552337	0.023097	6.561	0
149	160	ICRTDYPGTENM	10	1399.6	0	1400.546	0.016259	0	0	6.162	0.009
149	160	ICRTDYPGTENM	10	1399.6	0.25	1404.935	0.109545	4.389726	0.110745	6.176	0.002
149	160	ICRTDYPGTENM	10	1399.6	0.5	1405.005	0.123062	4.459073	0.124131	6.173	0.004
149	160	ICRTDYPGTENM	10	1399.6	1	1404.881	0.081438	4.33576	0.083045	6.177	0.003
149	160	ICRTDYPGTENM	10	1399.6	2	1404.649	0.07684	4.103377	0.078541	6.178	4E-04
149	160	ICRTDYPGTENM	10	1399.6	5	1404.496	0.071058	3.94999	0.072895	6.176	0.002
151	160	RTDYPGTENM	8	1183.5	0	1184.243	0.038738	0	0	5.883	0.009
151	160	RTDYPGTENM	8	1183.5	0.25	1187.892	0.060007	3.648957	0.071425	5.892	0.002
151	160	RTDYPGTENM	8	1183.5	0.5	1187.897	0.024674	3.653449	0.045929	5.887	0.005
151	160	RTDYPGTENM	8	1183.5	1	1187.826	0.055434	3.582306	0.067628	5.894	0.003
151	160	RTDYPGTENM	8	1183.5	2	1187.676	0.063159	3.43244	0.074093	5.892	0.001
151	160	RTDYPGTENM	8	1183.5	5	1187.604	0.041119	3.360563	0.056493	5.891	0.005

Start	Ende	Sequenz	MaxUptake	MHP	Exposure	Center	Center SD	Uptake	Uptake SD	RT	RT SD
152	160	TDYPGTENM	7	1027.4	0	1027.944	0.016553	0	0	6.402	0.01
152	160	TDYPGTENM	7	1027.4	0.25	1031.535	0.27955	3.59044	0.28004	6.409	0.005
152	160	TDYPGTENM	7	1027.4	0.5	1031.529	0.291589	3.584702	0.292059	6.405	0.006
152	160	TDYPGTENM	7	1027.4	1	1031.503	0.289191	3.558815	0.289665	6.411	0.003
152	160	TDYPGTENM	7	1027.4	2	1031.34	0.305047	3.3956	0.305496	6.411	0.002
152	160	TDYPGTENM	7	1027.4	5	1031.275	0.299321	3.330708	0.299779	6.409	0.004
159	164	NMVIPT	4	674.354	0	674.731	0.019339	0	0	6.881	0.009
159	164	NMVIPT	4	674.354	0.25	677.2404	0.024427	2.509394	0.031155	6.891	0.004
159	164	NMVIPT	4	674.354	0.5	677.1711	0.031316	2.440072	0.036806	6.89	0.006
159	164	NMVIPT	4	674.354	1	677.2422	0.015383	2.511201	0.024711	6.89	0.002
159	164	NMVIPT	4	674.354	2	677.1389	0.016941	2.407889	0.02571	6.889	0.004
159	164	NMVIPT	4	674.354	5	677.1367	0.018678	2.405638	0.026886	6.888	0.004
159	165	NMVIPTY	5	837.418	0	837.9671	0.039624	0	0	7.631	0.009
159	165	NMVIPTY	5	837.418	0.25	840.8303	0.1878	2.863129	0.191934	7.644	0.006
159	165	NMVIPTY	5	837.418	0.5	840.9101	0.167148	2.942949	0.17178	7.637	0.005
159	165	NMVIPTY	5	837.418	1	840.8752	0.155262	2.908076	0.160238	7.64	0.002
159	165	NMVIPTY	5	837.418	2	840.8139	0.187129	2.84679	0.191278	7.641	0.002
159	165	NMVIPTY	5	837.418	5	840.7974	0.18802	2.830257	0.192149	7.638	0.006
159	167	NMVIPTYVQ	7	1064.54	0	1065.106	0.017302	0	0	7.533	0.006
159	167	NMVIPTYVQ	7	1064.54	0.25	1070.038	0.053092	4.932561	0.05584	7.538	0.006
159	167	NMVIPTYVQ	7	1064.54	0.5	1070.078	0.039728	4.972579	0.043332	7.538	0.008
159	167	NMVIPTYVQ	7	1064.54	1	1070.01	0.053805	4.904207	0.056518	7.543	0.001
159	167	NMVIPTYVQ	7	1064.54	2	1069.879	0.028908	4.773605	0.03369	7.543	0.004
159	167	NMVIPTYVQ	7	1064.54	5	1069.831	0.010105	4.72497	0.020036	7.539	0.001
160	164	MVIPT	3	560.311	0	560.6538	0.010751	0	0	6.721	0.008
160	164	MVIPT	3	560.311	0.25	562.3146	0.003015	1.660742	0.011165	6.732	0.002
160	164	MVIPT	3	560.311	0.5	562.308	0.008341	1.654194	0.013607	6.728	0.005
160	164	MVIPT	3	560.311	1	562.283	0.009811	1.629117	0.014555	6.731	0.002
160	164	MVIPT	3	560.311	2	562.2454	0.011444	1.591541	0.015702	6.728	6E-04
160	164	MVIPT	3	560.311	5	562.2243	0.012778	1.570439	0.016699	6.728	0.006
160	165	MVIPTY	4	723.375	0	723.9035	0.007203	0	0	7.543	0.009
160	165	MVIPTY	4	723.375	0.25	725.5299	0.05354	1.626365	0.054022	7.547	0.006
160	165	MVIPTY	4	723.375	0.5	725.5774	0.034525	1.673898	0.035268	7.548	0.005
160	165	MVIPTY	4	723.375	1	725.5387	0.017597	1.635189	0.019014	7.551	5E-04
160	165	MVIPTY	4	723.375	2	725.3297	0	1.426143	0.007203	7.552	0
160	165	MVIPTY	4	723.375	5	725.3052	0.020308	1.401694	0.021548	7.548	0.003
160	167	MVIPTYVQ	6	950.502	0	951.0833	0.005146	0	0	7.429	0.007
160	167	MVIPTYVQ	6	950.502	0.25	955.0268	0.09681	3.94347	0.096946	7.438	0.002
160	167	MVIPTYVQ	6	950.502	0.5	954.9426	0.093658	3.859298	0.093799	7.428	0.007
160	167	MVIPTYVQ	6	950.502	1	954.8271	0.028203	3.743783	0.028668	7.436	0.002
160	167	MVIPTYVQ	6	950.502	2	954.8224	0.076627	3.739117	0.076799	7.434	0.003
160	167	MVIPTYVQ	6	950.502	5	954.4599	0.007774	3.376648	0.009323	7.431	0.004
160	169	MVIPTYVQAG	8	1078.56	0	1079.194	0.049583	0	0	7.358	0.006
160	169	MVIPTYVQAG	8	1078.56	0.25	1079.367	0.122105	0.17276	0.131788	7.375	0.002
160	169	MVIPTYVQAG	8	1078.56	0.5	1079.486	0.059722	0.292055	0.077622	7.373	0.004
160	169	MVIPTYVQAG	8	1078.56	1	1079.726	0.097687	0.531572	0.10955	7.377	0.002
160	169	MVIPTYVQAG	8	1078.56	2	1079.988	0.148672	0.793704	0.156722	7.374	0.002
160	169	MVIPTYVQAG	8	1078.56	5	1080.434	0.226743	1.239618	0.232101	7.372	0.004
160	172	MVIPTYVQAGDSL	11	1393.7	0	1394.593	0.037918	0	0	8.089	0.007
160	172	MVIPTYVQAGDSL	11	1393.7	0.25	1395.008	0.06268	0.415631	0.073257	8.103	0.001
160	172	MVIPTYVQAGDSL	11	1393.7	0.5	1395.571	0.107507	0.978347	0.113998	8.093	0.005
160	172	MVIPTYVQAGDSL	11	1393.7	1	1395.457	0.230081	0.864273	0.233184	8.099	0.002
160	172	MVIPTYVQAGDSL	11	1393.7	2	1395.793	0.100791	1.199887	0.107688	8.101	1E-04
160	172	MVIPTYVQAGDSL	11	1393.7	5	1396.016	0	1.423026	0.037918	8.086	0
160	175	MVIPTYVQAGDSLPLT	13	1704.89	0	1706.183	0.202246	0	0	8.254	0.01
160	175	MVIPTYVQAGDSLPLT	13	1704.89	0.25	1706.464	0.108698	0.280746	0.229605	8.267	0.004
160	175	MVIPTYVQAGDSLPLT	13	1704.89	0.5	1706.325	0.04664	0.142084	0.207554	8.264	0.004
160	175	MVIPTYVQAGDSLPLT	13	1704.89	1	1706.675	0.174547	0.491413	0.267151	8.267	0.001
160	175	MVIPTYVQAGDSLPLT	13	1704.89	2	1706.973	0.147702	0.789915	0.250438	8.264	1E-04
160	175	MVIPTYVQAGDSLPLT	13	1704.89	5	1707.135	0.053341	0.951879	0.299162	8.262	0.009
160	176	MVIPTYVQAGDSLPLTV	14	1803.96	0	1805.171	0.140925	0	0	8.707	0.007
160	176	MVIPTYVQAGDSLPLTV	14	1803.96	0.25	1805.209	0.02506	0.038498	0.143135	8.722	0.002
160	176	MVIPTYVQAGDSLPLTV	14	1803.96	0.5	1805.281	0.030245	0.110656	0.144134	8.719	0.005
160	176	MVIPTYVQAGDSLPLTV	14	1803.96	1	1805.378	0.022182	0.207574	0.14266	8.723	0.002
160	176	MVIPTYVQAGDSLPLTV	14	1803.96	2	1805.479	0.063585	0.308316	0.154605	8.721	0.002
160	176	MVIPTYVQAGDSLPLTV	14	1803.96	5	1805.625	0.066479	0.454051	0.155818	8.716	0.008
160	179	MVIPTYVQAGDSLPLTVDDQ	17	2146.11	0	2147.506	0.212911	0	0	8.518	0.009
160	179	MVIPTYVQAGDSLPLTVDDQ	17	2146.11	0.25	2147.765	0.154774	0.259329	0.263222	8.533	0.002
160	179	MVIPTYVQAGDSLPLTVDDQ	17	2146.11	0.5	2147.722	0.126488	0.216469	0.247649	8.535	5E-04
160	179	MVIPTYVQAGDSLPLTVDDQ	17	2146.11	1	2147.842	0.187273	0.336472	0.283553	8.535	0.003
160	179	MVIPTYVQAGDSLPLTVDDQ	17	2146.11	2	2148.157	0.286164	0.651063	0.35668	8.53	0.003
160	179	MVIPTYVQAGDSLPLTVDDQ	17	2146.11	5	2148.227	0.152153	0.721625	0.26169	8.528	0.011
160	181	MVIPTYVQAGDSLPLTVDDQDT	19	2362.18	0	2363.92	0.298273	0	0	8.575	0.007
160	181	MVIPTYVQAGDSLPLTVDDQDT	19	2362.18	0.25	2364.671	0.291869	0.751348	0.417318	8.578	0.002
160	181	MVIPTYVQAGDSLPLTVDDQDT	19	2362.18	0.5	2364.864	0.116297	0.944396	0.320144	8.576	0.002
160	181	MVIPTYVQAGDSLPLTVDDQDT	19	2362.18	1	2365.12	0.070497	1.200317	0.306491	8.583	0.003
160	181	MVIPTYVQAGDSLPLTVDDQDT	19	2362.18	2	2365.486	0.101618	1.566704	0.315108	8.575	0.005
160	181	MVIPTYVQAGDSLPLTVDDQDT	19	2362.18	5	2365.661	0.088739	1.741361	0.311194	8.57	0.013
160	182	MVIPTYVQAGDSLPLTVDDQDTY	20	2525.25	0	2527.139	0.369883	0	0	8.796	0.01
160	182	MVIPTYVQAGDSLPLTVDDQDTY	20	2525.25	0.25	2527.89	0.273576	0.75032	0.460062	8.808	0.006
160	182	MVIPTYVQAGDSLPLTVDDQDTY	20	2525.25	0.5	2528.138	0.103633	0.99878	0.384126	8.801	0.01
160	182	MVIPTYVQAGDSLPLTVDDQDTY	20	2525.25	1	2528.326	0.018945	1.186462	0.370368	8.801	0.003
160	182	MVIPTYVQAGDSLPLTVDDQDTY	20	2525.25	2	2528.63	0.054696	1.490198	0.373905	8.805	0.004
160	182	MVIPTYVQAGDSLPLTVDDQDTY	20	2525.25	5	2528.742	0.07092	1.60304	0.37662	8.798	0.009
161	165	VIPTY	3	592.334	0	592.6427	0.010973	0	0	6.498	0.006
161	165	VIPTY	3	592.334	0.25	594.1878	0.05851	1.545118	0.05953	6.513	0.004
161	165	VIPTY	3	592.334	0.5	594.223	0.029223	1.580319	0.031215	6.51	0.006
161	165	VIPTY	3	592.334	1	594.1967	0.026915	1.553941	0.029066	6.511	0.002
161	165	VIPTY	3	592.334	2	594.1116	0.026563	1.468928	0.02874	6.511	0.004
161	165	VIPTY	3	592.334	5	594.089	0.021671	1.446307	0.024291	6.512	0.003
161	175	VIPTYVQAGDSLPLT	12	1573.85	0	1574.868	0.018793	0	0	7.785	0.006
161	175	VIPTYVQAGDSLPLT	12	1573.85	0.25	1575.14	0.014353	0.272212	0.023647	7.798	0.004
161	175	VIPTYVQAGDSLPLT	12	1573.85	0.5	1575.175	0.014165	0.307126	0.023533	7.793	0.005
161	175	VIPTYVQAGDSLPLT	12	1573.85	1	1575.653	0.267376	0.784918	0.268036	7.795	6E-04
161	175	VIPTYVQAGDSLPLT	12	1573.85	2	1575.991	0.16746	1.123172	0.168511	7.795	0.002
161	175	VIPTYVQAGDSLPLT	12	1573.85	5	1576.224	0.027078	1.356092	0.03296	7.792	0.005
161	176	VIPTYVQAGDSLPLTV	13	1672.92	0	1673.909	0.02955	0	0	8.345	0.007
161	176	VIPTYVQAGDSLPLTV	13	1672.92	0.25	167					

Start	Ende	Sequenz	MaxUptake	MHP	Exposure	Center	Center SD	Uptake	Uptake SD	RT	RT SD
161	176	VIPTYVQAGDSLPLTV	13	1672.92	0.5	1674.379	0	0.470071	0.02955	8.346	0
161	176	VIPTYVQAGDSLPLTV	13	1672.92	1	1674.471	0.019605	0.562011	0.035462	8.356	2E-04
161	176	VIPTYVQAGDSLPLTV	13	1672.92	2	1674.948	0.076033	1.038624	0.081573	8.355	0.002
161	176	VIPTYVQAGDSLPLTV	13	1672.92	5	1675.402	0.145362	1.492743	0.148335	8.348	0.008
161	179	VIPTYVQAGDSLPLTVVDQ	16	2015.07	0	2016.057	0.32341	0	0	8.171	0.009
161	179	VIPTYVQAGDSLPLTVVDQ	16	2015.07	0.25	2017.367	0.481455	1.310184	0.579993	8.187	0.006
161	179	VIPTYVQAGDSLPLTVVDQ	16	2015.07	0.5	2017.234	0.311846	1.177167	0.449268	8.185	0.004
161	179	VIPTYVQAGDSLPLTVVDQ	16	2015.07	2	2018.049	0.246927	1.991899	0.466899	8.18	0.004
161	179	VIPTYVQAGDSLPLTVVDQ	16	2015.07	5	2018.692	0.454484	2.634943	0.557808	8.181	2E-04
161	181	VIPTYVQAGDSLPLTVVDQDT	18	2231.14	0	2232.463	0.254775	0	0	8.247	0.005
161	181	VIPTYVQAGDSLPLTVVDQDT	18	2231.14	0.25	2234.553	0.03893	2.089853	0.257732	8.252	8E-04
161	181	VIPTYVQAGDSLPLTVVDQDT	18	2231.14	0.5	2234.668	0.255433	2.204704	0.360772	8.251	0.003
161	181	VIPTYVQAGDSLPLTVVDQDT	18	2231.14	1	2234.919	0.101817	2.456202	0.274367	8.262	0.006
161	181	VIPTYVQAGDSLPLTVVDQDT	18	2231.14	2	2235.484	0.155036	3.020761	0.298239	8.24	0.005
161	181	VIPTYVQAGDSLPLTVVDQDT	18	2231.14	5	2235.688	0.274078	3.224959	0.374204	8.242	0.016
165	173	VYQAGDSLPL	7	949.463	0	949.867	0.056074	0	0	6.632	0.002
165	173	VYQAGDSLPL	7	949.463	0.25	953.7149	0.129363	3.847898	0.140993	6.636	0.004
165	173	VYQAGDSLPL	7	949.463	0.5	953.6481	0.062795	3.781105	0.084187	6.639	0.001
165	173	VYQAGDSLPL	7	949.463	1	953.7078	0.042087	3.840743	0.070111	6.636	0.002
165	173	VYQAGDSLPL	7	949.463	2	953.6084	0.110789	3.741369	0.124171	6.637	2E-04
165	173	VYQAGDSLPL	7	949.463	5	953.6179	0.061946	3.750872	0.083556	6.637	0.004
166	173	VQAGDSLPL	6	786.399	0	786.773	0.026869	0	0	6.249	0.09
166	173	VQAGDSLPL	6	786.399	0.25	789.9855	0	3.212475	0.026869	6.242	0
166	173	VQAGDSLPL	6	786.399	0.5	790.0678	0	3.294782	0.026869	6.238	0
166	173	VQAGDSLPL	6	786.399	1	789.9953	0.012624	3.222284	0.029687	6.239	0.003
166	173	VQAGDSLPL	6	786.399	2	789.8659	0.036824	3.09293	0.045585	6.237	0.004
166	173	VQAGDSLPL	6	786.399	5	789.8171	0.045686	3.044128	0.053002	6.236	0.004
166	174	VQAGDSLPL	7	899.483	0	899.9101	0.00845	0	0	7.387	0.007
166	174	VQAGDSLPL	7	899.483	0.25	903.6587	0.011544	3.748606	0.014306	7.395	0.002
166	174	VQAGDSLPL	7	899.483	0.5	903.7378	0.029483	3.827726	0.03067	7.388	0.004
166	174	VQAGDSLPL	7	899.483	1	903.7492	0.014707	3.839061	0.016962	7.394	0.002
166	174	VQAGDSLPL	7	899.483	2	903.5799	0.060073	3.669812	0.060664	7.391	0.002
166	174	VQAGDSLPL	7	899.483	5	903.5556	0.022736	3.645553	0.024256	7.388	0.004
166	175	VQAGDSLPLT	8	1000.53	0	1001.027	0.025783	0	0	6.826	0.009
166	175	VQAGDSLPLT	8	1000.53	0.25	1005.263	0.339297	4.236362	0.340275	6.832	0.008
166	175	VQAGDSLPLT	8	1000.53	0.5	1005.076	0.456621	4.049247	0.457349	6.826	0.007
166	175	VQAGDSLPLT	8	1000.53	1	1005.146	0.335352	4.119166	0.336341	6.83	0.005
166	175	VQAGDSLPLT	8	1000.53	2	1004.847	0.413753	3.820524	0.414555	6.828	0.006
166	175	VQAGDSLPLT	8	1000.53	5	1004.82	0.36972	3.792842	0.370618	6.825	0.01
166	177	VQAGDSLPLTVV	10	1198.67	0	1199.305	0.041395	0	0	7.985	0.007
166	177	VQAGDSLPLTVV	10	1198.67	0.25	1205.035	0.18856	5.729309	0.193051	7.997	7E-04
166	177	VQAGDSLPLTVV	10	1198.67	0.5	1205.055	0.204329	5.749528	0.20848	7.983	0.008
166	177	VQAGDSLPLTVV	10	1198.67	1	1205.088	0.15896	5.782741	0.164261	7.991	0.001
166	177	VQAGDSLPLTVV	10	1198.67	2	1204.801	0.14763	5.495823	0.153324	7.993	8E-04
166	177	VQAGDSLPLTVV	10	1198.67	5	1204.798	0.162873	5.492905	0.168051	7.989	0.008
166	178	VQAGDSLPLTVVD	11	1313.69	0	1314.383	0.032822	0	0	7.626	0.008
166	178	VQAGDSLPLTVVD	11	1313.69	0.25	1320.64	0.352608	6.25635	0.354132	7.631	0.012
166	178	VQAGDSLPLTVVD	11	1313.69	0.5	1320.639	0.17553	6.256072	0.178573	7.623	0.005
166	178	VQAGDSLPLTVVD	11	1313.69	1	1320.664	0.182566	6.281102	0.185493	7.627	0.001
166	178	VQAGDSLPLTVVD	11	1313.69	2	1320.451	0.126747	6.068132	0.130928	7.626	9E-04
166	178	VQAGDSLPLTVVD	11	1313.69	5	1320.359	0.208813	5.975686	0.211376	7.625	0.003
166	181	VQAGDSLPLTVVDQDT	14	1657.83	0	1658.743	0.050372	0	0	7.656	0.008
166	181	VQAGDSLPLTVVDQDT	14	1657.83	0.25	1665.097	0.094293	6.354818	0.106904	7.641	0.001
166	181	VQAGDSLPLTVVDQDT	14	1657.83	0.5	1664.976	0.216137	6.233091	0.221929	7.646	5E-04
166	181	VQAGDSLPLTVVDQDT	14	1657.83	1	1665.053	0	6.310343	0.050372	7.643	0
166	181	VQAGDSLPLTVVDQDT	14	1657.83	2	1665.138	0.091966	6.395582	0.104858	7.648	9E-04
166	181	VQAGDSLPLTVVDQDT	14	1657.83	5	1664.969	0.091348	6.225956	0.104315	7.641	0.002
166	182	VQAGDSLPLTVVDQDTY	15	1820.89	0	1822.006	0.04365	0	0	7.996	0.007
166	182	VQAGDSLPLTVVDQDTY	15	1820.89	0.25	1827.985	0.208746	5.979767	0.213261	8.001	0.008
166	182	VQAGDSLPLTVVDQDTY	15	1820.89	0.5	1828.175	0.193428	6.169483	0.198292	7.999	0.007
166	182	VQAGDSLPLTVVDQDTY	15	1820.89	1	1828.06	0.023113	6.054058	0.049391	8	0.002
166	182	VQAGDSLPLTVVDQDTY	15	1820.89	2	1827.873	0.177149	5.867044	0.182448	8.002	8E-04
166	182	VQAGDSLPLTVVDQDTY	15	1820.89	5	1827.874	0.028911	5.868708	0.052356	8	0.008
166	183	VQAGDSLPLTVVDQDTYY	16	1983.95	0	1985.039	0.044552	0	0	8.315	0.071
166	183	VQAGDSLPLTVVDQDTYY	16	1983.95	0.25	1992.545	0.100488	7.505486	0.109922	8.352	0.008
166	183	VQAGDSLPLTVVDQDTYY	16	1983.95	0.5	1992.488	0.24674	7.448175	0.25073	8.345	0.013
166	183	VQAGDSLPLTVVDQDTYY	16	1983.95	1	1992.468	0	7.428967	0.044552	8.353	0
166	183	VQAGDSLPLTVVDQDTYY	16	1983.95	2	1992.197	0.172547	7.15772	0.178206	8.294	0.066
166	183	VQAGDSLPLTVVDQDTYY	16	1983.95	5	1991.918	0.077888	6.87849	0.08973	8.347	0.007
168	174	AGDSLPL	5	672.356	0	672.6629	0.014987	0	0	7.351	0.007
168	174	AGDSLPL	5	672.356	0.25	674.8639	0.029683	2.200961	0.033252	7.366	0.001
168	174	AGDSLPL	5	672.356	0.5	674.9965	0.039173	2.333566	0.041942	7.36	0.007
168	174	AGDSLPL	5	672.356	1	675.0034	0.083953	2.340457	0.08528	7.366	0.002
168	174	AGDSLPL	5	672.356	2	674.9543	0.022416	2.291374	0.026965	7.363	0.002
168	174	AGDSLPL	5	672.356	5	674.8942	0.039501	2.231297	0.042249	7.359	0.006
168	175	AGDSLPLT	6	773.404	0	773.7637	0.023804	0	0	6.771	0.006
168	175	AGDSLPLT	6	773.404	0.25	776.8525	0.002013	3.088701	0.023889	6.777	0.002
168	175	AGDSLPLT	6	773.404	0.5	776.9068	0.005195	3.143032	0.024365	6.772	1E-03
168	175	AGDSLPLT	6	773.404	1	776.9484	0.026986	3.184691	0.035985	6.777	9E-04
168	175	AGDSLPLT	6	773.404	2	776.7634	0.031904	2.999652	0.039806	6.775	5E-04
168	175	AGDSLPLT	6	773.404	5	776.7289	0.011388	2.965104	0.026388	6.773	0.007
168	177	AGDSLPLTVV	8	971.541	0	971.9727	0.064764	0	0	7.978	0.006
168	177	AGDSLPLTVV	8	971.541	0.25	976.7358	0.237408	4.76306	0.246083	7.984	0.006
168	177	AGDSLPLTVV	8	971.541	0.5	976.8167	0.135848	4.843977	0.150496	7.976	0.01
168	177	AGDSLPLTVV	8	971.541	1	976.7531	0.214269	4.780406	0.223843	7.983	0.003
168	177	AGDSLPLTVV	8	971.541	2	976.6036	0.048816	4.630933	0.081101	7.986	0.003
168	177	AGDSLPLTVV	8	971.541	5	976.4279	0.309228	4.455234	0.315937	7.978	0.01
168	181	AGDSLPLTVVDQDT	12	1430.7	0	1431.532	0.054781	0	0	7.866	0.005
168	181	AGDSLPLTVVDQDT	12	1430.7	0.25	1431.648	0.061583	0.1164	0.082422	7.874	0.005
168	181	AGDSLPLTVVDQDT	12	1430.7	0.5	1431.612	0.054467	0.079837	0.07725	7.899	0.005
168	181	AGDSLPLTVVDQDT	12	1430.7	1	1431.617	0.011719	0.085098	0.05602	7.905	0.012
168	181	AGDSLPLTVVDQDT	12	1430.7	2	1431.596	0.0503	0.064483	0.074371	7.917	0.014
168	181	AGDSLPLTVVDQDT	12	1430.7	5	1431.594	0.012692	0.061881	0.056232	7.933	0.007
168	182	AGDSLPLTVVDQDTY	13	1593.76	0	1594.666	0.024261	0	0	7.965	0.007
168	182	AGDSLPLTVVDQDTY	13	1593.76	0.25	1600.904	0.132345	6.237487	0.134551	7.952	0.004
168	182	AGDSLPLTVVDQDTY	13	1593.76	0.5	1601	0.192342	6.333517	0.193866	7.952	0.002
168	182	AGDSLPLTVVDQDTY	13	1593.76	1	1601.067	0.043715	6.400673	0.049996	7.951	####

Start	Ende	Sequenz	MaxUptake	MHP	Exposure	Center	Center SD	Uptake	Uptake SD	RT	RT SD
168	182	AGDSLPLTVVDQDTY	13	1593.76	5	1601.025	0.064803	6.359218	0.069195	7.95	0.006
169	182	GDSLPLTVVDQDTY	12	1522.73	0	1523.527	0.086886	0	0	8.21	0.005
169	182	GDSLPLTVVDQDTY	12	1522.73	0.25	1528.11	0.033373	4.583615	0.093075	8.223	0.001
169	182	GDSLPLTVVDQDTY	12	1522.73	0.5	1528.71	0	5.183639	0.086886	8.22	0
169	182	GDSLPLTVVDQDTY	12	1522.73	1	1528.799	0.015015	5.272636	0.088174	8.223	0.003
169	182	GDSLPLTVVDQDTY	12	1522.73	2	1528.856	0.010093	5.329822	0.08747	8.221	0.002
169	182	GDSLPLTVVDQDTY	12	1522.73	5	1528.559	0.206775	5.032776	0.224288	8.217	0.009
170	182	DSLPLTVVDQDTY	11	1465.71	0	1466.518	0.071587	0	0	7.996	0.007
170	182	DSLPLTVVDQDTY	11	1465.71	0.25	1470.187	0.056872	3.668786	0.091429	8.012	0.004
170	182	DSLPLTVVDQDTY	11	1465.71	0.5	1470.448	0.070746	3.930187	0.100647	8.002	0.003
170	182	DSLPLTVVDQDTY	11	1465.71	1	1470.515	0	3.997111	0.071587	8.006	0
170	182	DSLPLTVVDQDTY	11	1465.71	2	1470.135	0.089905	3.616754	0.114925	8.012	0.002
170	182	DSLPLTVVDQDTY	11	1465.71	5	1470.31	0	3.791696	0.071587	8.004	0
175	182	TVVDQDTY	7	940.426	0	940.8965	0.019991	0	0	5.993	0.005
175	182	TVVDQDTY	7	940.426	0.25	944.8928	0.058006	3.996271	0.061354	6.004	0.003
175	182	TVVDQDTY	7	940.426	0.5	944.8717	0.038409	3.975201	0.0433	5.999	0.007
175	182	TVVDQDTY	7	940.426	1	944.8321	0.022032	3.935539	0.02975	6.003	0.003
175	182	TVVDQDTY	7	940.426	2	944.6801	0.024897	3.783586	0.03193	6.002	0.002
175	182	TVVDQDTY	7	940.426	5	944.6555	0.046195	3.758958	0.050335	6.002	0.004
176	182	VVDQDTY	6	839.378	0	839.9057	0.055317	0	0	5.69	0.009
176	182	VVDQDTY	6	839.378	0.25	842.2205	0.185205	2.314858	0.19329	5.7	0.004
176	182	VVDQDTY	6	839.378	0.5	842.3856	0.185077	2.479914	0.193167	5.695	0.006
176	182	VVDQDTY	6	839.378	1	842.4508	0.241138	2.545085	0.247401	5.697	0.002
176	182	VVDQDTY	6	839.378	2	842.409	0.249167	2.503299	0.255233	5.696	0.003
176	182	VVDQDTY	6	839.378	5	842.3978	0.237843	2.492173	0.244191	5.697	0.004
176	183	VVDQDTYY	7	1002.44	0	1002.932	0.022765	0	0	6.666	0.005
176	183	VVDQDTYY	7	1002.44	0.25	1006.357	0.052937	3.424359	0.057624	6.678	0.005
176	183	VVDQDTYY	7	1002.44	0.5	1006.377	0.037803	3.444936	0.044128	6.674	0.009
176	183	VVDQDTYY	7	1002.44	1	1006.416	0.024184	3.483941	0.033213	6.68	0.001
176	183	VVDQDTYY	7	1002.44	2	1006.364	0.03298	3.431412	0.040074	6.677	0.002
176	183	VVDQDTYY	7	1002.44	5	1006.362	0.058099	3.429877	0.0624	6.674	0.004
177	182	VDQDTY	5	740.31	0	740.818	0.028679	0	0	5.45	0.007
177	182	VDQDTY	5	740.31	0.25	742.5655	0.034435	1.747517	0.044814	5.459	0.003
177	182	VDQDTY	5	740.31	0.5	742.6711	0.014335	1.853113	0.032062	5.455	0.004
177	182	VDQDTY	5	740.31	1	742.7569	0.005248	1.938933	0.029155	5.458	7E-04
177	182	VDQDTY	5	740.31	2	742.749	0.019114	1.931076	0.034465	5.456	0.001
177	182	VDQDTY	5	740.31	5	742.7402	0.009562	1.922254	0.030231	5.456	0.004
177	183	VDQDTYY	6	903.373	0	903.8025	0.009852	0	0	6.564	0.006
177	183	VDQDTYY	6	903.373	0.25	906.4111	0.085209	2.608601	0.085777	6.571	0.004
177	183	VDQDTYY	6	903.373	0.5	906.5688	0.017671	2.766291	0.020232	6.566	0.005
177	183	VDQDTYY	6	903.373	1	906.6525	0.031996	2.850018	0.033479	6.566	0.001
177	183	VDQDTYY	6	903.373	2	906.4663	0.013685	2.663787	0.016862	6.568	0.004
177	183	VDQDTYY	6	903.373	5	906.5071	0.054121	2.704592	0.055011	6.566	0.004
178	183	DQDTYY	5	804.305	0	804.6745	0.015348	0	0	6.559	0.007
178	183	DQDTYY	5	804.305	0.25	806.9908	0.057482	2.316289	0.059496	6.565	0.004
178	183	DQDTYY	5	804.305	0.5	806.9545	0.016608	2.279927	0.022614	6.561	0.005
178	183	DQDTYY	5	804.305	1	806.9628	0.059488	2.288244	0.061436	6.563	0.002
178	183	DQDTYY	5	804.305	2	806.9361	0.098726	2.261528	0.099912	6.564	0.003
178	183	DQDTYY	5	804.305	5	806.8965	0.103775	2.221946	0.104904	6.562	0.005
182	186	YTTWQ	4	760.33	0	760.6787	0.014036	0	0	7.262	0.007
182	186	YTTWQ	4	760.33	0.25	762.8855	0.019698	2.206811	0.024187	7.262	0.003
182	186	YTTWQ	4	760.33	0.5	762.9369	0.058364	2.258264	0.060028	7.264	0.002
182	186	YTTWQ	4	760.33	1	762.8868	0.037537	2.208144	0.040076	7.268	0.004
182	186	YTTWQ	4	760.33	2	762.8357	0.049019	2.157075	0.050989	7.268	0.001
182	186	YTTWQ	4	760.33	5	762.8177	0.069638	2.139055	0.071038	7.264	0.004
182	188	YTTWQGL	6	930.436	0	930.9666	0.064174	0	0	8.768	0.006
182	188	YTTWQGL	6	930.436	0.25	933.6962	0	2.729571	0.064174	8.779	0
182	188	YTTWQGL	6	930.436	0.5	933.8037	0	2.837099	0.064174	8.778	0
182	188	YTTWQGL	6	930.436	1	933.7966	0	2.829962	0.064174	8.783	0
182	188	YTTWQGL	6	930.436	2	933.8237	0	2.857089	0.064174	8.785	0
182	188	YTTWQGL	6	930.436	5	933.8351	0.107868	2.868491	0.125514	8.776	0.012
182	194	YTTWQGLKTSAQY	12	1608.77	0	1609.932	0.091811	0	0	7.586	0.005
182	194	YTTWQGLKTSAQY	12	1608.77	0.25	1614.794	0.799798	4.861634	0.080505	7.588	0.016
182	194	YTTWQGLKTSAQY	12	1608.77	0.5	1615.607	0.465223	5.675205	0.047419	7.587	0.009
182	194	YTTWQGLKTSAQY	12	1608.77	1	1615.652	0.536606	5.720193	0.054440	7.595	0.002
182	194	YTTWQGLKTSAQY	12	1608.77	2	1615.519	0.503737	5.586732	0.051203	7.595	0.003
182	194	YTTWQGLKTSAQY	12	1608.77	5	1615.459	0.446931	5.52697	0.045626	7.592	0.002
183	187	YTWQG	4	654.288	0	654.5904	0.009848	0	0	6.913	0.009
183	187	YTWQG	4	654.288	0.25	656.7811	0.017709	2.190698	0.020263	6.927	0.003
183	187	YTWQG	4	654.288	0.5	656.8378	0.040328	2.24746	0.041513	6.924	0.004
183	187	YTWQG	4	654.288	1	656.8008	0.026211	2.210437	0.028	6.927	0.003
183	187	YTWQG	4	654.288	2	656.7465	0.032681	2.156098	0.034133	6.926	0.004
183	187	YTWQG	4	654.288	5	656.7076	0.037939	2.117234	0.039196	6.924	0.006
183	188	YTWQGL	5	767.372	0	767.8017	0.026429	0	0	8.375	0.006
183	188	YTWQGL	5	767.372	0.25	770.427	0.078697	2.625237	0.083016	8.388	0.002
183	188	YTWQGL	5	767.372	0.5	770.525	0.025134	2.723202	0.036472	8.385	0.004
183	188	YTWQGL	5	767.372	1	770.5146	0.008571	2.71282	0.027784	8.389	9E-04
183	188	YTWQGL	5	767.372	2	770.4152	0.015181	2.613458	0.030479	8.387	0.002
183	188	YTWQGL	5	767.372	5	770.4359	0.010583	2.634151	0.028469	8.382	0.009
183	190	YTWQGLKT	7	996.515	0	997.2779	0.093294	0	0	6.995	0.009
183	190	YTWQGLKT	7	996.515	0.25	1001.018	0.149221	3.739996	0.175985	7.01	0.003
183	190	YTWQGLKT	7	996.515	0.5	1001.108	0.023297	3.830139	0.096159	7.008	0.007
183	190	YTWQGLKT	7	996.515	1	1001.134	0.026841	3.855971	0.097078	7.01	0.002
183	190	YTWQGLKT	7	996.515	2	1001.023	0.025924	3.744927	0.096829	7.008	0.003
183	190	YTWQGLKT	7	996.515	5	1000.984	0.037356	3.706209	0.100495	7.009	0.004
183	193	YTWQGLKTSAQ	10	1282.64	0	1282.64	0.396867	0	0	6.762	0.006
183	193	YTWQGLKTSAQ	10	1282.64	0.25	1289.039	0.301015	4.881949	0.49811	6.768	0.002
183	193	YTWQGLKTSAQ	10	1282.64	0.5	1289.329	0.197943	5.171422	0.443492	6.769	0.006
183	193	YTWQGLKTSAQ	10	1282.64	1	1289.387	0.200625	5.229659	0.444695	6.771	0.002
183	193	YTWQGLKTSAQ	10	1282.64	2	1289.183	0.202762	5.02599	0.445664	6.771	0.003
183	193	YTWQGLKTSAQ	10	1282.64	5	1289.132	0.196804	4.974254	0.442985	6.769	0.005
183	194	YTWQGLKTSAQY	11	1445.71	0	1447.232	0.202464	0	0	7.208	0.008
183	194	YTWQGLKTSAQY	11	1445.71	0.25	1452.109	0.308725	4.877475	0.369192	7.216	0.002
183	194	YTWQGLKTSAQY	11	1445.71	0.5	1452.529	0.022679	5.297489	0.20373	7.21	0.006
183	194	YTWQGLKTSAQY	11	1445.71	1	1452.574	0	5.341779	0.202464	7.219	0
183	194	YTWQGLKTSAQY	11	1445.71	2	1452.336	0.044244	5.103915	0.207242	7.212	7E-04
183	194	YTWQGLKTSAQY	11	1445.71	5	1452.327	0.061085	5.095086	0.211478	7.213	0.005

Start	Ende	Sequenz	MaxUptake	MHP	Exposure	Center	Center SD	Uptake	Uptake SD	RT	RT SD
184	190	TWQGLKT	6	833.452	0	833.9466	0.082992	0	0	6.344	0.005
184	190	TWQGLKT	6	833.452	0.25	837.2579	0.070684	3.311331	0.109013	6.36	0.004
184	190	TWQGLKT	6	833.452	0.5	837.1939	0.106135	3.247306	0.13473	6.355	0.007
184	190	TWQGLKT	6	833.452	1	837.2351	0.059608	3.288582	0.10218	6.358	0.005
184	190	TWQGLKT	6	833.452	2	837.1036	0.075156	3.157026	0.111964	6.359	0.004
184	190	TWQGLKT	6	833.452	5	837.0814	0.108915	3.13485	0.136931	6.36	0.005
184	193	TWQGLKTSAQ	9	1119.58	0	1120.411	0.088167	0	0	6.092	0.006
184	193	TWQGLKTSAQ	9	1119.58	0.25	1125.389	0.154327	4.978561	0.177736	6.102	0.004
184	193	TWQGLKTSAQ	9	1119.58	0.5	1125.492	0.04502	5.081295	0.098996	6.097	0.006
184	193	TWQGLKTSAQ	9	1119.58	1	1125.507	0.118484	5.096408	0.147688	6.1	0.004
184	193	TWQGLKTSAQ	9	1119.58	2	1125.314	0.061164	4.903201	0.107305	6.099	0.004
184	193	TWQGLKTSAQ	9	1119.58	5	1125.277	0.0397	4.866525	0.096693	6.101	0.003
185	193	WQGLKTSAQ	8	1018.53	0	1019.027	0.034183	0	0	5.891	0.01
185	193	WQGLKTSAQ	8	1018.53	0.25	1023.806	0.360178	4.778943	0.361796	5.899	0.003
185	193	WQGLKTSAQ	8	1018.53	0.5	1024.181	0.133238	5.153661	0.137553	5.891	0.005
185	193	WQGLKTSAQ	8	1018.53	1	1023.644	0.127286	4.616308	0.131796	5.903	0.006
185	193	WQGLKTSAQ	8	1018.53	2	1023.779	0.165281	4.751288	0.168779	5.901	0.002
185	193	WQGLKTSAQ	8	1018.53	5	1023.572	0.137336	4.544105	0.141526	5.901	0.006
194	200	YVNNAG	6	800.357	0	800.7313	0.029431	0	0	5.537	0.011
194	200	YVNNAG	6	800.357	0.25	801.3234	0.079346	0.592083	0.084628	5.548	0.002
194	200	YVNNAG	6	800.357	0.5	801.5261	0.010912	0.79472	0.031389	5.545	0.002
194	200	YVNNAG	6	800.357	1	801.4221	0.00253	0.690769	0.029539	5.55	4E-04
194	200	YVNNAG	6	800.357	2	801.5105	0.040012	0.779195	0.04967	5.546	0.003
194	200	YVNNAG	6	800.357	5	801.5681	0.021324	0.836763	0.036344	5.544	0.005
194	201	YVNNAGI	7	913.441	0	913.908	0.063101	0	0	6.941	0.005
194	201	YVNNAGI	7	913.441	0.25	914.5856	0.148704	0.677602	0.161538	6.952	0.006
194	201	YVNNAGI	7	913.441	0.5	914.7191	0.22487	0.811164	0.233556	6.952	0.008
194	201	YVNNAGI	7	913.441	1	914.7857	0.213084	0.877758	0.222231	6.953	0.004
194	201	YVNNAGI	7	913.441	2	915.0184	0.161809	1.110458	0.173677	6.947	0.006
194	201	YVNNAGI	7	913.441	5	915.1755	0.22336	1.26759	0.232102	6.952	0.004
194	202	YVNNAGIS	8	1000.47	0	1001.075	0.025666	0	0	6.37	0.007
194	202	YVNNAGIS	8	1000.47	0.25	1002.339	0.164932	1.26405	0.166918	6.378	0.004
194	202	YVNNAGIS	8	1000.47	0.5	1002.513	0.145025	1.437956	0.147279	6.377	0.006
194	202	YVNNAGIS	8	1000.47	1	1002.628	0.123906	1.552676	0.126536	6.381	0.002
194	202	YVNNAGIS	8	1000.47	2	1002.752	0.165002	1.676351	0.166987	6.382	0.002
194	202	YVNNAGIS	8	1000.47	5	1002.966	0.181797	1.891218	0.1836	6.379	0.003
194	203	YVNNAGISV	9	1099.54	0	1100.212	0.059224	0	0	7.236	0.009
194	203	YVNNAGISV	9	1099.54	0.25	1101.902	0.165777	1.690366	0.176039	7.246	0.003
194	203	YVNNAGISV	9	1099.54	0.5	1102.124	0.164789	1.912518	0.175108	7.238	0.007
194	203	YVNNAGISV	9	1099.54	1	1102.366	0.161561	2.154154	0.172074	7.243	0.003
194	203	YVNNAGISV	9	1099.54	2	1102.453	0.20136	2.241825	0.209889	7.24	0.004
194	203	YVNNAGISV	9	1099.54	5	1102.708	0.201522	2.496666	0.210045	7.24	0.003
194	204	YVNNAGISVE	10	1228.58	0	1229.535	0.161448	0	0	6.852	0.01
194	204	YVNNAGISVE	10	1228.58	0.25	1231.177	0.158757	1.642638	0.226427	6.864	0.004
194	204	YVNNAGISVE	10	1228.58	0.5	1231.513	0.096431	1.978534	0.188054	6.859	0.004
194	204	YVNNAGISVE	10	1228.58	1	1231.856	0.076014	2.321374	0.178448	6.863	0.001
194	204	YVNNAGISVE	10	1228.58	2	1232.107	0.066809	2.572359	0.174725	6.861	0.002
194	204	YVNNAGISVE	10	1228.58	5	1232.477	0.072688	2.942409	0.177057	6.861	0.006
195	201	YVNNAGI	6	750.378	0	750.7378	0.056716	0	0	6.123	0.049
195	201	YVNNAGI	6	750.378	0.25	750.9106	0.020428	0.172878	0.060283	6.062	0.001
195	201	YVNNAGI	6	750.378	0.5	750.8847	0.02527	0.146957	0.062091	6.064	0.002
195	201	YVNNAGI	6	750.378	1	750.8613	0.032871	0.123519	0.065553	6.074	0.004
195	201	YVNNAGI	6	750.378	2	750.7905	0	0.052764	0.056716	6.075	0
195	201	YVNNAGI	6	750.378	5	750.8447	0	0.106956	0.056716	6.1	0
195	202	YVNNAGIS	7	837.41	0	838.0044	0.031155	0	0	5.474	0.008
195	202	YVNNAGIS	7	837.41	0.25	839.519	0.028669	1.514611	0.042339	5.483	0.004
195	202	YVNNAGIS	7	837.41	0.5	839.7184	0.015303	1.71392	0.034711	5.478	0.004
195	202	YVNNAGIS	7	837.41	1	839.7828	0.047244	1.778413	0.056592	5.482	1E-03
195	202	YVNNAGIS	7	837.41	2	839.8697	0.022769	1.865304	0.038588	5.48	8E-04
195	202	YVNNAGIS	7	837.41	5	840.0223	0.003966	2.01782	0.031406	5.479	0.005
195	203	YVNNAGISV	8	936.479	0	937.0247	0.034728	0	0	6.634	0.004
195	203	YVNNAGISV	8	936.479	0.25	939.0435	0.080078	2.018813	0.087284	6.635	0.004
195	203	YVNNAGISV	8	936.479	0.5	939.3158	0.035898	2.291081	0.049946	6.632	0.006
195	203	YVNNAGISV	8	936.479	1	939.5445	0.002522	2.519802	0.034819	6.635	0.001
195	203	YVNNAGISV	8	936.479	2	939.7048	0.006401	2.680047	0.035313	6.635	0.002
195	203	YVNNAGISV	8	936.479	5	939.9053	0.016808	2.880636	0.038581	6.634	0.003
195	204	YVNNAGISVE	9	1065.52	0	1066.329	0.119518	0	0	6.234	0.008
195	204	YVNNAGISVE	9	1065.52	0.25	1067.959	0.221995	1.629096	0.252123	6.248	0.003
195	204	YVNNAGISVE	9	1065.52	0.5	1068.281	0.25664	1.951222	0.283105	6.242	0.005
195	204	YVNNAGISVE	9	1065.52	1	1068.627	0.230865	2.297603	0.259968	6.244	0.003
195	204	YVNNAGISVE	9	1065.52	2	1068.848	0.240993	2.518325	0.269003	6.241	0.004
195	204	YVNNAGISVE	9	1065.52	5	1069.209	0.284315	2.87965	0.308415	6.239	0.005
198	204	NAGISVE	6	689.346	0	689.6898	0.022546	0	0	5.848	0.007
198	204	NAGISVE	6	689.346	0.25	693.1791	0.049824	3.48925	0.054688	5.862	0.002
198	204	NAGISVE	6	689.346	0.5	693.1993	0.022971	3.509514	0.032187	5.857	0.005
198	204	NAGISVE	6	689.346	1	693.1649	0.017007	3.475096	0.028241	5.86	0.001
198	204	NAGISVE	6	689.346	2	693.0333	0.032268	3.343522	0.039365	5.857	0.003
198	204	NAGISVE	6	689.346	5	692.9957	0.015694	3.305857	0.02747	5.854	0.003
199	204	AGISVE	5	575.304	0	575.5505	0.046473	0	0	5.912	0.008
199	204	AGISVE	5	575.304	0.25	577.4591	0.04849	1.908533	0.067164	5.924	0.002
199	204	AGISVE	5	575.304	0.5	577.6329	0.10823	2.08241	0.117786	5.918	0.005
199	204	AGISVE	5	575.304	1	577.8993	0.008578	2.348781	0.047258	5.921	0.002
199	204	AGISVE	5	575.304	2	577.9809	0.052963	2.430361	0.070461	5.92	7E-04
199	204	AGISVE	5	575.304	5	578.1666	0.035823	2.616032	0.058677	5.92	0.005
209	224	WGSSSSGVGNWAPLNF	14	1665.77	0	1666.811	0.155082	0	0	9.302	0.007
209	224	WGSSSSGVGNWAPLNF	14	1665.77	0.25	1666.889	0.103531	0.078029	0.186465	9.318	0.003
209	224	WGSSSSGVGNWAPLNF	14	1665.77	0.5	1666.987	0.011403	0.17647	0.155501	9.316	0.005
209	224	WGSSSSGVGNWAPLNF	14	1665.77	1	1667.027	0.046017	0.215996	0.161766	9.321	0.002
209	224	WGSSSSGVGNWAPLNF	14	1665.77	2	1667.072	0.051797	0.261818	0.163504	9.322	0.002
209	224	WGSSSSGVGNWAPLNF	14	1665.77	5	1667.18	0.066261	0.369705	0.168645	9.306	0.018
220	224	APLNF	3	561.303	0	561.5655	0.024749	0	0	7.626	0.007
220	224	APLNF	3	561.303	0.25	561.5929	0.044523	0.027457	0.050939	7.642	0.006
220	224	APLNF	3	561.303	0.5	561.6427	0.055223	0.077183	0.060515	7.63	0.005
220	224	APLNF	3	561.303	1	561.5999	0.057042	0.034387	0.06218	7.636	0.003
220	224	APLNF	3	561.303	2	561.6762	0.00915	0.110725	0.026387	7.635	0.004
220	224	APLNF	3	561.303	5	561.6329	0.045292	0.067386	0.051613	7.63	0.005
220	233	APLNFGAGSSDGVA	12	1262.6	0	1263.364	0.036798	0	0	8.115	0.025
220	233	APLNFGAGSSDGVA	12	1262.6	0.25	1263.42	0.028669	0.055462	0.046647	8.129	0.009

Start	Ende	Sequenz	MaxUptake	MHP	Exposure	Center	Center SD	Uptake	Uptake SD	RT	RT SD
220	233	APLNFGAGSSDGVA	12	1262.6	0.5	1263.462	0.060554	0.097899	0.070858	8.149	0.006
220	233	APLNFGAGSSDGVA	12	1262.6	1	1263.351	0.097788	-0.01302	0.104482	8.17	0.017
220	233	APLNFGAGSSDGVA	12	1262.6	2	1263.397	0.036273	0.032473	0.05167	8.188	0.014
220	233	APLNFGAGSSDGVA	12	1262.6	5	1263.359	0.052366	-0.00559	0.064002	8.186	0.013
220	234	APLNFGAGSSDGVA	13	1425.66	0	1426.329	0.040365	0	0	7.707	0.006
220	234	APLNFGAGSSDGVA	13	1425.66	0.25	1427.581	0.077699	1.251533	0.087559	7.719	0.002
220	234	APLNFGAGSSDGVA	13	1425.66	0.5	1427.714	0.04079	1.384518	0.057386	7.717	0.004
220	234	APLNFGAGSSDGVA	13	1425.66	1	1427.807	0	1.47742	0.040365	7.718	0
220	234	APLNFGAGSSDGVA	13	1425.66	2	1428.057	0.115222	1.727945	0.122088	7.721	0.002
220	234	APLNFGAGSSDGVA	13	1425.66	5	1428.309	0.027369	1.979918	0.048769	7.715	0.005
221	235	PLNFGAGSSDGVA	13	1467.71	0	1468.529	0.054705	0	0	8.214	0.007
221	235	PLNFGAGSSDGVA	13	1467.71	0.25	1471.348	0.091865	2.818676	0.10692	8.225	5E-04
221	235	PLNFGAGSSDGVA	13	1467.71	0.5	1471.683	0.093173	3.153751	0.108045	8.225	0.002
221	235	PLNFGAGSSDGVA	13	1467.71	1	1471.498	0.051126	2.969222	0.074876	8.224	0.004
221	235	PLNFGAGSSDGVA	13	1467.71	2	1471.401	0.076658	2.871449	0.094176	8.225	3E-04
221	235	PLNFGAGSSDGVA	13	1467.71	5	1471.347	0	2.817996	0.054705	8.209	0
223	234	NFGAGSSDGVA	11	1144.49	0	1145.059	0.037706	0	0	7.146	0.007
223	234	NFGAGSSDGVA	11	1144.49	0.25	1147.309	0.314308	2.250224	0.316561	7.16	0.004
223	234	NFGAGSSDGVA	11	1144.49	0.5	1147.44	0.06441	2.380354	0.074636	7.155	0.003
223	234	NFGAGSSDGVA	11	1144.49	1	1147.449	0.093489	2.389985	0.100807	7.161	0.005
223	234	NFGAGSSDGVA	11	1144.49	2	1147.304	0.065071	2.244458	0.075207	7.156	0.005
223	234	NFGAGSSDGVA	11	1144.49	5	1147.318	0.237707	2.259197	0.240679	7.155	0.007
224	233	FGAGSSDGVA	9	867.384	0	867.8067	0.022276	0	0	5.859	0.008
224	233	FGAGSSDGVA	9	867.384	0.25	872.117	0.046134	4.310343	0.051231	5.875	0.002
224	233	FGAGSSDGVA	9	867.384	0.5	872.1733	0.016888	4.366654	0.027954	5.87	0.005
224	233	FGAGSSDGVA	9	867.384	1	872.1103	0.035974	4.30361	0.042313	5.873	0.002
224	233	FGAGSSDGVA	9	867.384	2	871.8779	0.009188	4.071193	0.024096	5.869	0.004
224	233	FGAGSSDGVA	9	867.384	5	871.8476	0.043076	4.040896	0.048495	5.865	0.004
224	234	FGAGSSDGVA	10	1030.45	0	1030.957	0.023657	0	0	6.801	0.009
224	234	FGAGSSDGVA	10	1030.45	0.25	1035.838	0.159862	4.880385	0.161603	6.812	0.004
224	234	FGAGSSDGVA	10	1030.45	0.5	1035.915	0.124091	4.958184	0.126326	6.806	0.004
224	234	FGAGSSDGVA	10	1030.45	1	1035.618	0.296654	4.660623	0.297596	6.811	0.003
224	234	FGAGSSDGVA	10	1030.45	2	1035.404	0.304711	4.446757	0.305628	6.808	0.002
224	234	FGAGSSDGVA	10	1030.45	5	1035.255	0.366861	4.297548	0.367623	6.805	0.008
224	235	FGAGSSDGVA	11	1143.53	0	1144.114	0.020591	0	0	7.986	0.007
224	235	FGAGSSDGVA	11	1143.53	0.25	1148.375	0.081397	4.260368	0.083961	8.006	0.01
224	235	FGAGSSDGVA	11	1143.53	0.5	1148.543	0.042928	4.428327	0.047611	8.005	0.007
224	235	FGAGSSDGVA	11	1143.53	1	1148.392	0.097484	4.278042	0.099635	8.009	0.013
224	235	FGAGSSDGVA	11	1143.53	2	1148.28	0.110072	4.165839	0.111981	8.01	0.013
224	235	FGAGSSDGVA	11	1143.53	5	1148.011	0.079294	3.897128	0.081924	7.992	0.005
224	243	FGAGSSDGVA	17	1992.97	0	1994.141	0.049544	0	0	7.66	0.006
224	243	FGAGSSDGVA	17	1992.97	0.25	1998.495	0.070913	4.35417	0.086505	7.661	0.002
224	243	FGAGSSDGVA	17	1992.97	0.5	1998.88	0.061132	4.73829	0.076687	7.659	0.005
224	243	FGAGSSDGVA	17	1992.97	1	1999.218	0.010461	5.077042	0.050636	7.662	0.003
224	243	FGAGSSDGVA	17	1992.97	2	1999.314	0.044393	5.172332	0.066523	7.669	0.001
224	243	FGAGSSDGVA	17	1992.97	5	1999.441	0.008647	5.299222	0.050292	7.664	0.003
225	234	GAGSSDGVA	9	883.379	0	884.039	0.039174	0	0	5.929	0.007
225	234	GAGSSDGVA	9	883.379	0.25	885.0789	0.08417	1.039897	0.09284	5.942	0.002
225	234	GAGSSDGVA	9	883.379	0.5	885.1551	0.085278	1.116036	0.093845	5.937	0.005
225	234	GAGSSDGVA	9	883.379	1	885.2386	0.088882	1.19954	0.097132	5.939	0.002
225	234	GAGSSDGVA	9	883.379	2	885.2918	0.147107	1.252724	0.152234	5.936	0.003
225	234	GAGSSDGVA	9	883.379	5	885.5013	0.179675	1.462316	0.183896	5.934	0.002
225	235	GAGSSDGVA	10	996.463	0	997.12	0.028093	0	0	7.394	0.008
225	235	GAGSSDGVA	10	996.463	0.25	997.9854	0.159747	0.865421	0.162198	7.406	0.003
225	235	GAGSSDGVA	10	996.463	0.5	998.0425	0.169455	0.922494	0.171767	7.403	0.002
225	235	GAGSSDGVA	10	996.463	1	998.1338	0.185782	1.013781	0.187894	7.406	0.003
225	235	GAGSSDGVA	10	996.463	2	998.189	0.215208	1.069047	0.217034	7.404	0.002
225	235	GAGSSDGVA	10	996.463	5	998.4235	0.25427	1.303473	0.255817	7.405	0.002
225	236	GAGSSDGVA	11	1083.5	0	1083.988	0.032846	0	0	6.74	0.009
225	236	GAGSSDGVA	11	1083.5	0.25	1090.284	0.058445	6.296788	0.067042	6.744	0.003
225	236	GAGSSDGVA	11	1083.5	0.5	1090.309	0.013072	6.321756	0.035352	6.747	0.003
225	236	GAGSSDGVA	11	1083.5	1	1090.224	0.03364	6.236308	0.047016	6.748	0.005
225	236	GAGSSDGVA	11	1083.5	2	1089.941	0.016784	5.952967	0.036886	6.751	0.003
225	236	GAGSSDGVA	11	1083.5	5	1089.885	0.043297	5.89734	0.054346	6.746	0.006
230	235	DGVA	5	637.319	0	637.7112	0.100446	0	0	7.653	0.006
230	235	DGVA	5	637.319	0.25	637.7019	0.165133	-0.00938	0.193283	7.669	0.007
230	235	DGVA	5	637.319	0.5	637.9865	0.033366	0.275236	0.15842	7.657	0.006
230	235	DGVA	5	637.319	1	637.9449	0.01498	0.233627	0.101556	7.664	0.002
230	235	DGVA	5	637.319	2	637.9174	0.02315	0.20618	0.103079	7.664	0.004
230	235	DGVA	5	637.319	5	637.9632	0.03143	0.251957	0.105248	7.658	0.003
235	248	LSLIPNPNNGNALN	11	1450.76	0	1451.537	0.00746	0	0	7.612	0.007
235	248	LSLIPNPNNGNALN	11	1450.76	0.25	1456.267	2.27E-13	4.730527	0.00746	7.619	0
235	248	LSLIPNPNNGNALN	11	1450.76	0.5	1456.423	0.024171	4.886167	0.025296	7.618	0.005
235	248	LSLIPNPNNGNALN	11	1450.76	1	1456.608	0	5.071287	0.00746	7.625	0
235	248	LSLIPNPNNGNALN	11	1450.76	2	1456.339	0	4.802142	0.00746	7.619	0
235	248	LSLIPNPNNGNALN	11	1450.76	5	1456.435	0.185784	4.898692	0.185934	7.621	0.004
235	249	LSLIPNPNNGNALNF	12	1597.83	0	1599.214	0.295328	0	0	8.665	0.007
235	249	LSLIPNPNNGNALNF	12	1597.83	0.25	1600.105	0.336003	0.890729	0.447344	8.686	0.002
235	249	LSLIPNPNNGNALNF	12	1597.83	0.5	1600.455	0.104272	1.240991	0.313195	8.68	0.008
235	249	LSLIPNPNNGNALNF	12	1597.83	1	1600.715	0.031851	1.50096	0.297041	8.687	0.001
235	249	LSLIPNPNNGNALNF	12	1597.83	2	1600.945	0.054727	1.731237	0.300356	8.684	0.002
235	249	LSLIPNPNNGNALNF	12	1597.83	5	1600.932	0.024359	1.718178	0.296331	8.676	0.013
236	244	SLIPNPNNG	6	925.474	0	925.8821	0.020672	0	0	6.52	0.008
236	244	SLIPNPNNG	6	925.474	0.25	928.9447	0.162704	3.062593	0.164012	6.534	0.004
236	244	SLIPNPNNG	6	925.474	0.5	929.1412	0.032159	3.259118	0.03823	6.532	0.005
236	244	SLIPNPNNG	6	925.474	1	929.1143	0.006731	3.232214	0.02174	6.53	0.003
236	244	SLIPNPNNG	6	925.474	2	928.9865	0.006504	3.104428	0.021671	6.532	0.005
236	244	SLIPNPNNG	6	925.474	5	928.822	0.023469	2.939894	0.031274	6.53	0.006
236	248	SLIPNPNNGNALN	10	1337.68	0	1338.727	0.077828	0	0	6.919	0.007
236	248	SLIPNPNNGNALN	10	1337.68	0.25	1343.11	0.104499	4.383405	0.130297	6.942	0.004
236	248	SLIPNPNNGNALN	10	1337.68	0.5	1343.346	0.121113	4.619882	0.143964	6.932	0.008
236	248	SLIPNPNNGNALN	10	1337.68	1	1343.481	0.140164	4.754763	0.160322	6.936	9E-04
236	248	SLIPNPNNGNALN	10	1337.68	2	1343.376	0.11836	4.649529	0.141656	6.929	0.001
236	248	SLIPNPNNGNALN	10	1337.68	5	1343.264	0.124029	4.537415	0.146425	6.933	0.01
236	249	SLIPNPNNGNALNF	11	1484.75	0	1486.228	0.217865	0	0	8.213	0.007
236	249	SLIPNPNNGNALNF	11	1484.75	0.25	1489.063	0.10478	2.834559	0.024752	8.224	0.004
236	249	SLIPNPNNGNALNF	11	1484.75	0.5	1489.311	0.122511	3.082395	0.024948	8.22	0.004

Start	Ende	Sequenz	MaxUptake	MHP	Exposure	Center	Center SD	Uptake	Uptake SD	RT	RT SD
236	249	SLIPNPNNGNALNF	11	1484.75	1	1489.591	0.114237	3.362864	0.024598	8.222	0.002
236	249	SLIPNPNNGNALNF	11	1484.75	2	1489.652	0.144353	3.424298	0.026148	8.223	0.002
236	249	SLIPNPNNGNALNF	11	1484.75	5	1489.676	0.125172	3.447905	0.025163	8.219	0.008
237	243	LIPNPNN	4	781.42	0	781.7761	0.014897	0	0	5.361	0.01
237	243	LIPNPNN	4	781.42	0.25	784.2855	0.018552	2.509374	0.023793	5.38	0.002
237	243	LIPNPNN	4	781.42	0.5	784.2894	0.021252	2.513331	0.025954	5.377	0.003
237	243	LIPNPNN	4	781.42	1	784.3058	0.01938	2.529693	0.024444	5.377	0.001
237	243	LIPNPNN	4	781.42	2	784.1394	0.157409	2.363281	0.158112	5.376	0.002
237	243	LIPNPNN	4	781.42	5	783.9869	0.162669	2.210769	0.163349	5.378	0.004
237	248	LIPNPNNGNALN	9	1250.65	0	1251.43	0.051972	0	0	6.552	0.155
237	248	LIPNPNNGNALN	9	1250.65	0.25	1254.024	0.026105	2.59437	0.058159	6.618	9E-04
237	248	LIPNPNNGNALN	9	1250.65	0.5	1254.184	0.055962	2.753866	0.076373	6.615	0.003
237	248	LIPNPNNGNALN	9	1250.65	1	1254.534	0.208942	3.104594	0.215309	6.617	0.001
237	248	LIPNPNNGNALN	9	1250.65	2	1254.917	0.121759	3.487523	0.132387	6.615	0.001
237	248	LIPNPNNGNALN	9	1250.65	5	1255.363	0.021729	3.933558	0.056331	6.613	0.004
238	249	IPNPNNGNALNF	9	1284.63	0	1285.543	0.070258	0	0	7.587	0.007
238	249	IPNPNNGNALNF	9	1284.63	0.25	1288.794	0.272674	3.251107	0.28158	7.59	0.013
238	249	IPNPNNGNALNF	9	1284.63	0.5	1289.14	0.186026	3.596607	0.198851	7.59	0.006
238	249	IPNPNNGNALNF	9	1284.63	1	1289.41	0.172633	3.866664	0.186382	7.594	8E-04
238	249	IPNPNNGNALNF	9	1284.63	2	1289.457	0.185921	3.913896	0.198753	7.594	0.003
238	249	IPNPNNGNALNF	9	1284.63	5	1289.429	0.169362	3.886157	0.183357	7.59	0.003
239	249	PNPNNGNALNF	8	1171.55	0	1172.208	0.031571	0	0	8.209	0.008
239	249	PNPNNGNALNF	8	1171.55	0.25	1174.178	0.174179	1.96993	0.177017	8.221	0.005
239	249	PNPNNGNALNF	8	1171.55	0.5	1174.486	0.168138	2.277096	0.171077	8.219	0.005
239	249	PNPNNGNALNF	8	1171.55	1	1174.394	0.025439	2.185506	0.040545	8.222	0.001
239	249	PNPNNGNALNF	8	1171.55	2	1174.409	0.010323	2.200119	0.033216	8.221	0.003
239	249	PNPNNGNALNF	8	1171.55	5	1174.34	0.028891	2.131557	0.042795	8.22	0.008
241	249	PNNGNALNF	7	960.453	0	960.9773	0.009979	0	0	8.206	0.002
241	249	PNNGNALNF	7	960.453	0.25	962.7422	0.131515	1.76487	0.131893	8.218	8E-04
241	249	PNNGNALNF	7	960.453	0.5	962.976	0.161036	1.998706	0.161344	8.219	0.006
241	249	PNNGNALNF	7	960.453	1	963.0172	0	2.039947	0.009979	8.224	0
241	249	PNNGNALNF	7	960.453	2	963.0121	0.004089	2.034802	0.010785	8.222	0.002
241	249	PNNGNALNF	7	960.453	5	962.8984	0	1.921138	0.009979	8.221	0
250	255	NVKIVA	5	643.414	0	643.8239	0.015718	0	0	5.341	0.008
250	255	NVKIVA	5	643.414	0.25	644.559	0.036075	0.735111	0.039351	5.36	0.007
250	255	NVKIVA	5	643.414	0.5	644.6144	0.028218	0.790449	0.0323	5.354	0.007
250	255	NVKIVA	5	643.414	1	644.6047	0.036061	0.780768	0.039338	5.356	0.006
250	255	NVKIVA	5	643.414	2	644.5738	0.030588	0.749909	0.034391	5.355	0.006
250	255	NVKIVA	5	643.414	5	644.5641	0.039544	0.740164	0.042553	5.354	0.008
250	256	NVKIVAA	6	714.451	0	714.9182	0.030103	0	0	5.242	0.007
250	256	NVKIVAA	6	714.451	0.25	715.9328	0.038013	1.014588	0.048489	5.255	0.003
250	256	NVKIVAA	6	714.451	0.5	716.0954	0.034451	1.177202	0.04575	5.25	0.005
250	256	NVKIVAA	6	714.451	1	716.1939	0.0486	1.275757	0.057168	5.254	0.001
250	256	NVKIVAA	6	714.451	2	716.1923	0.05231	1.274116	0.060353	5.253	0.004
250	256	NVKIVAA	6	714.451	5	716.1688	0.048837	1.250663	0.057369	5.25	0.004
250	257	NVKIVAAD	7	829.478	0	829.9907	0.058054	0	0	5.155	0.008
250	257	NVKIVAAD	7	829.478	0.25	831.5494	0.061865	1.558701	0.084838	5.165	0.003
250	257	NVKIVAAD	7	829.478	0.5	831.7385	0.0801	1.747872	0.098925	5.163	0.004
250	257	NVKIVAAD	7	829.478	1	831.8362	0.06833	1.845565	0.089661	5.16	0.002
250	257	NVKIVAAD	7	829.478	2	831.8202	0.072649	1.829586	0.092995	5.162	0.003
250	257	NVKIVAAD	7	829.478	5	831.7909	0.089147	1.800219	0.106383	5.165	0.005
250	258	NVKIVAADD	8	944.505	0	945.1433	0.101787	0	0	5.211	0.009
250	258	NVKIVAADD	8	944.505	0.25	946.8041	0.065412	1.66077	0.120993	5.219	0.003
250	258	NVKIVAADD	8	944.505	0.5	946.9814	0.04694	1.838018	0.112089	5.216	0.004
250	258	NVKIVAADD	8	944.505	1	947.0789	0.059866	1.935595	0.118087	5.218	0.002
250	258	NVKIVAADD	8	944.505	2	947.0397	0.06637	1.896322	0.121514	5.218	0.001
250	258	NVKIVAADD	8	944.505	5	947.0319	0.072851	1.888587	0.125172	5.219	0.006
250	259	NVKIVAADD	9	1031.54	0	1032.091	0.076037	0	0	5.172	0.009
250	259	NVKIVAADD	9	1031.54	0.25	1034.413	0.090811	2.322355	0.118441	5.183	0.003
250	259	NVKIVAADD	9	1031.54	0.5	1034.622	0.086618	2.531584	0.115257	5.179	0.004
250	259	NVKIVAADD	9	1031.54	1	1034.701	0.056042	2.610003	0.094458	5.178	0.002
250	259	NVKIVAADD	9	1031.54	2	1034.684	0.069251	2.593291	0.102845	5.18	0.002
250	259	NVKIVAADD	9	1031.54	5	1034.585	0.050088	2.493983	0.091051	5.182	0.005
250	260	NVKIVAADDSS	10	1118.57	0	1119.267	0.057024	0	0	5.107	0.007
250	260	NVKIVAADDSS	10	1118.57	0.25	1121.949	0.083659	2.681798	0.101245	5.12	0.002
250	260	NVKIVAADDSS	10	1118.57	0.5	1122.174	0.052258	2.907379	0.077347	5.114	0.005
250	260	NVKIVAADDSS	10	1118.57	1	1122.283	0.052359	3.01562	0.077416	5.118	0.001
250	260	NVKIVAADDSS	10	1118.57	2	1122.22	0.029087	2.953171	0.064014	5.117	0.004
250	260	NVKIVAADDSS	10	1118.57	5	1122.176	0.059876	2.909365	0.082685	5.114	0.003
250	264	NVKIVAADDSSVTNG	14	1489.75	0	1490.73	0.084402	0	0	5.433	0.008
250	264	NVKIVAADDSSVTNG	14	1489.75	0.25	1495.229	0.300592	4.499715	0.312217	5.445	0.001
250	264	NVKIVAADDSSVTNG	14	1489.75	0.5	1495.753	0.180698	5.023283	0.199438	5.442	0.004
250	264	NVKIVAADDSSVTNG	14	1489.75	1	1495.816	0.060255	5.086803	0.103703	5.443	0.002
250	264	NVKIVAADDSSVTNG	14	1489.75	2	1495.647	0.12238	4.91768	0.148663	5.443	8E-04
250	264	NVKIVAADDSSVTNG	14	1489.75	5	1495.569	0.039294	4.839622	0.093101	5.438	0.004
250	266	NVKIVAADDSSVTNGEC	16	1721.8	0	1722.853	0.07365	0	0	5.896	0.012
250	266	NVKIVAADDSSVTNGEC	16	1721.8	0.25	1728.021	0.483085	5.167729	0.488667	5.904	0.002
250	266	NVKIVAADDSSVTNGEC	16	1721.8	0.5	1728.856	0.140885	6.002867	0.158974	5.9	0.006
250	266	NVKIVAADDSSVTNGEC	16	1721.8	1	1728.685	0.091292	5.831949	0.117297	5.909	0.006
250	266	NVKIVAADDSSVTNGEC	16	1721.8	2	1728.347	0.042222	5.494322	0.084894	5.91	6E-04
250	266	NVKIVAADDSSVTNGEC	16	1721.8	5	1728.215	0.145539	5.361964	0.163114	5.907	0.005
252	256	KIVAA	4	501.34	0	501.5742	0.015322	0	0	5.239	0.008
252	256	KIVAA	4	501.34	0.25	502.2738	0.020955	0.699609	0.025959	5.255	0.002
252	256	KIVAA	4	501.34	0.5	502.3499	0.032026	0.775682	0.035503	5.25	0.004
252	256	KIVAA	4	501.34	1	502.4406	0.021098	0.866429	0.026075	5.249	0.003
252	256	KIVAA	4	501.34	2	502.4332	0.007106	0.859026	0.016889	5.25	0.004
252	256	KIVAA	4	501.34	5	502.4057	0.042556	0.831531	0.04523	5.251	0.004
267	281	IYENGFSFGSGSDGCT	14	1493.58	0	1494.339	0.01231	0	0	6.477	0.008
267	281	IYENGFSFGSGSDGCT	14	1493.58	0.25	1498.853	0	4.514427	0.01231	6.487	0
267	281	IYENGFSFGSGSDGCT	14	1493.58	0.5	1499.208	0.238903	4.868679	0.23922	6.487	0.005
267	281	IYENGFSFGSGSDGCT	14	1493.58	1	1499.374	0.081581	5.035069	0.082505	6.491	5E-04
267	281	IYENGFSFGSGSDGCT	14	1493.58	2	1499.115	0.198954	4.775959	0.199334	6.492	2E-04
267	281	IYENGFSFGSGSDGCT	14	1493.58	5	1499.161	0.007735	4.821985	0.014538	6.487	0.003
282	291	VSVTAGKAKF	9	1007.59	0	1008.121	0.048199	0	0	5.402	0.008
282	291	VSVTAGKAKF	9	1007.59	0.25	1011.067	0.254647	2.946492	0.259168	5.419	0.005
282	291	VSVTAGKAKF	9	1007.59	0.5	1011.142	0.246749	3.021	0.251413	5.414	0.005
282	291	VSVTAGKAKF	9	1007.59	1	1011.132	0.2594	3.011883	0.26384	5.421	0.003

Start	Ende	Sequenz	MaxUptake	MHP	Exposure	Center	Center SD	Uptake	Uptake SD	RT	RT SD
282	291	VSVTAGKAKF	9	1007.59	2	1010.837	0.137529	2.71692	0.14573	5.418	0.005
282	291	VSVTAGKAKF	9	1007.59	5	1010.751	0.120935	2.630105	0.130187	5.414	0.005

7.4 SPR Bindungsuntersuchung von ScSun4C-Varianten

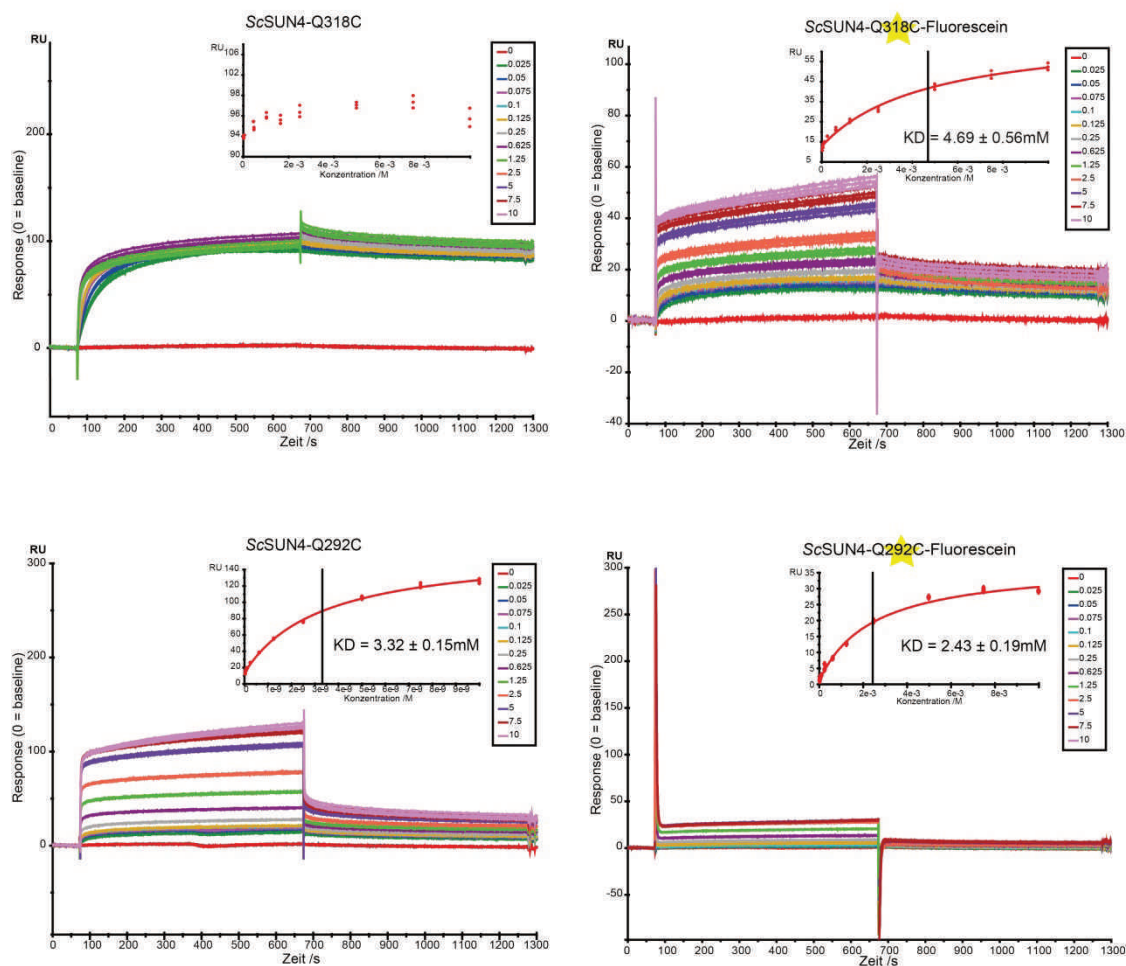


Abbildung 74: Interaktionsuntersuchung von SUN-Varianten aus *S. cerevisiae* (ScSun4C, P53616, 147-420), *C. albicans* (CaSun41C, Q59NP5, 143-418) gegen Laminarin (*Carbosynth*) mittels Oberflächenplasmonresonanz (SPR). Die Angabe der Bindungskonstanten erfolgte unter der Annahme $M_{\text{Laminarin}} = 4066 \text{ Da}$.

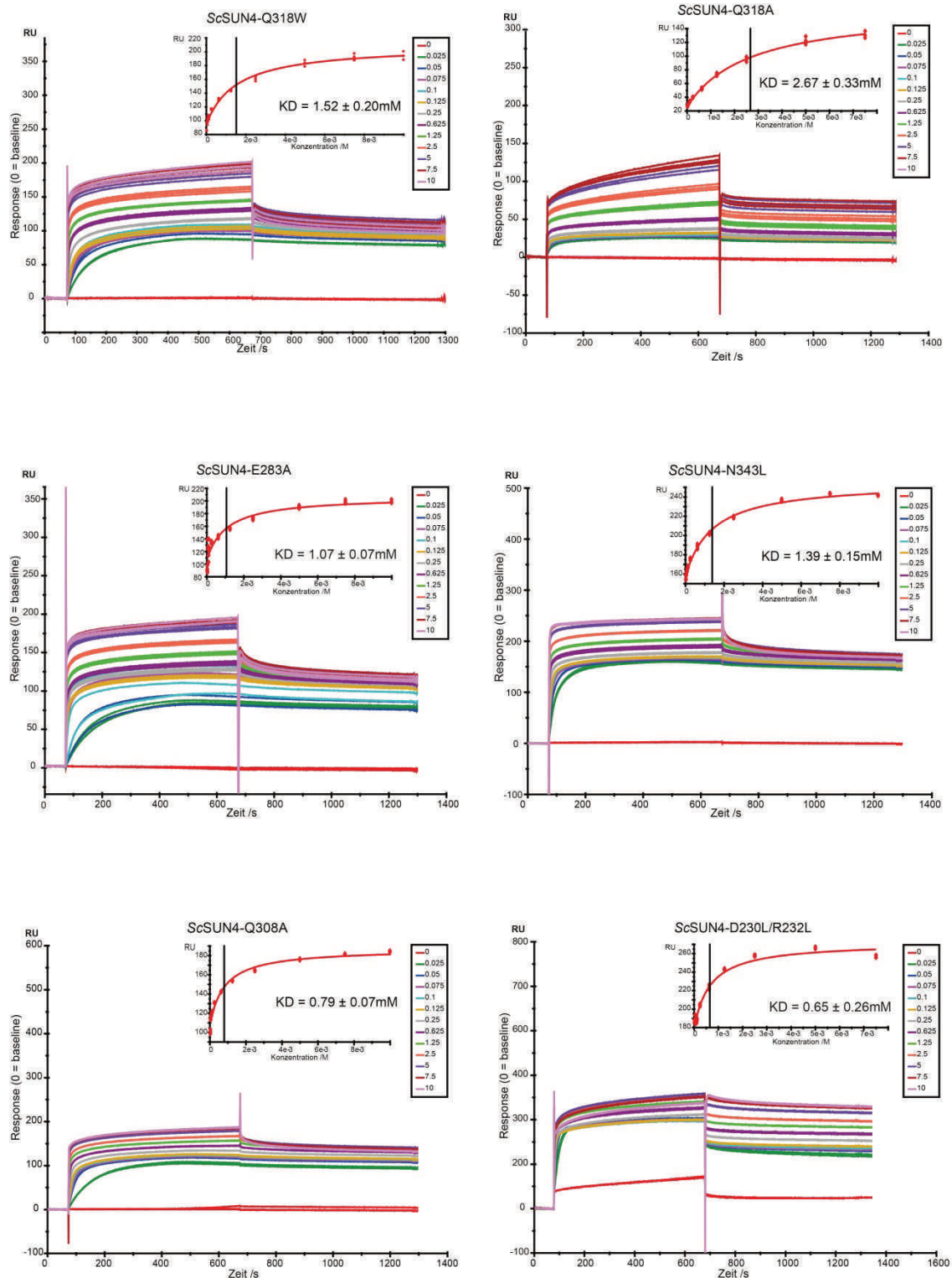


Abbildung 75: Interaktionsuntersuchung von SUN-Varianten aus *S. cerevisiae* (ScSun4C, P53616, 147-420), *C. albicans* (CaSun41C, Q59NP5, 143-418) gegen Laminarin (*Carbosynth*) mittels Oberflächenplasmonresonanz (SPR). Die Angabe der Bindungskonstanten erfolgte unter der Annahme $M_{\text{Laminarin}} = 4066$ Da.

7.5 CD-Spektren von SUN-Proteinen

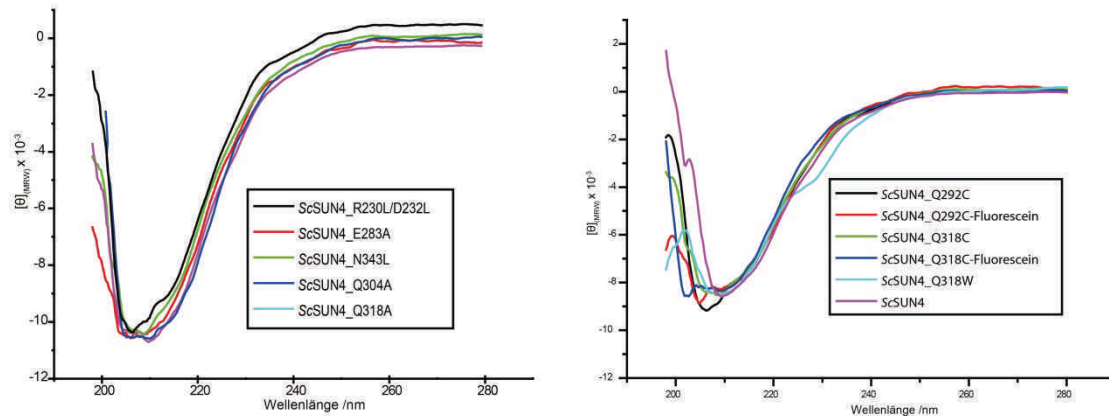


Abbildung 76: CD-Spektroskopische Untersuchungen bezüglich der strukturellen Konformität von SUN-Varianten in einem Wellenlängenbereich von 200 – 280 nm.

7.6 UV/Vis-Referenzspektrum Hämin-B

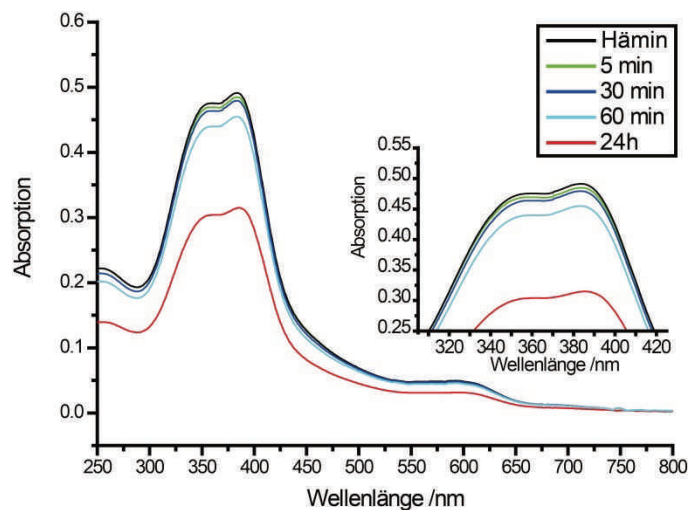
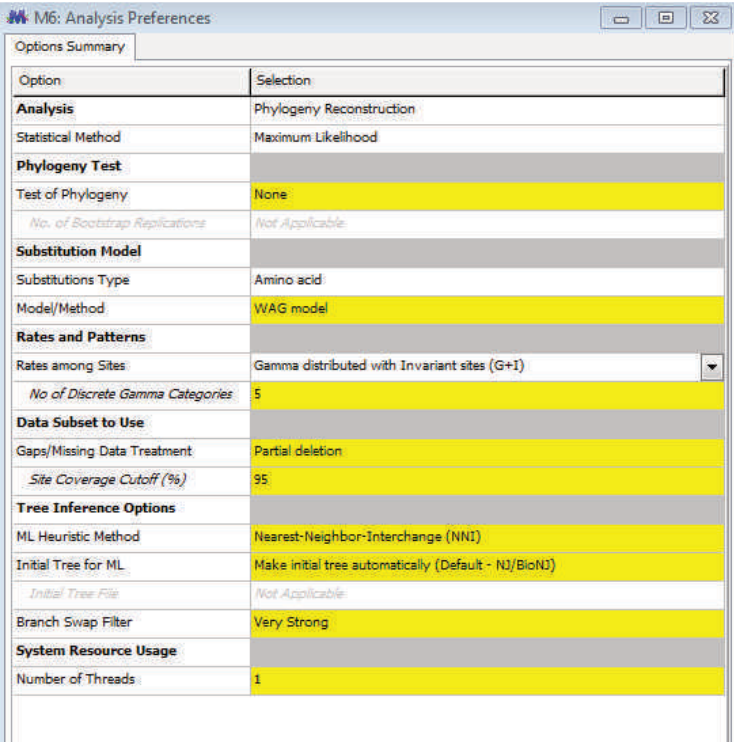


Abbildung 77: UV/Vis-Absorptionsspektrum von 10 µM Hämin-B (20 mM Tris 200 mM NaCl pH 8.0) bei 10 °C und einem Wellenlängenbereich von 250-800 nm. Der zeitliche Verlauf wurde dann für 5 min, 30 min, 60 min und 24 h verfolgt. Zusätzlich ist der Bereich 310-440 nm um die Soret-Bande vergrößert dargestellt.

7.7 MEGA6 – Einstellungen für die phylogenetische Rekonstruktion



The screenshot shows the 'M6: Analysis Preferences' dialog box in MEGA6. The 'Options Summary' tab is active, displaying a list of options and their selected values. The options are grouped into sections: Analysis, Phylogeny Test, Substitution Model, Rates and Patterns, Data Subset to Use, Tree Inference Options, and System Resource Usage.

Option	Selection
Analysis	Phylogeny Reconstruction
Statistical Method	Maximum Likelihood
Phylogeny Test	
Test of Phylogeny	None
No. of Bootstrap Replications	Not Applicable
Substitution Model	
Substitutions Type	Amino acid
Model/Method	WAG model
Rates and Patterns	
Rates among Sites	Gamma distributed with Invariant sites (G+I)
No. of Discrete Gamma Categories	5
Data Subset to Use	
Gaps/Missing Data Treatment	Partial deletion
Site Coverage Cutoff (%)	95
Tree Inference Options	
ML Heuristic Method	Nearest-Neighbor-Interchange (NNI)
Initial Tree for ML	Make initial tree automatically (Default - NJ/BioNJ)
Initial Tree File	Not Applicable
Branch Swap Filter	Very Strong
System Resource Usage	
Number of Threads	1

Abbildung 78: In MEGA6⁹⁶ verwendete Rekonstruktion nach dem *Maximum Likelihood* Modell zur Erstellung des phylogenetischen Baums.

Danksagung

Herrn Professor Dr. Lars-Oliver Essen danke ich für die Möglichkeit in seinem Arbeitskreis diese Arbeit anfertigen zu dürfen. Darüber hinaus danke ich ihm für die stetige Unterstützung sowie die Freiheit eigenen wissenschaftlichen Ideen nachgehen zu können.

Herrn Professor Dr. Hans-Ulrich Mösch möchte ich der freundlichen Übernahme des Zweitgutachtens und Herrn Prof. Dr. Norbert Hampp für die Teilnahme an meiner Prüfungskommission danken.

Dr. Silke von Horsten und Dr. Stefan Brückner danke ich für die Durchsicht dieser Arbeit und die anregenden Unterhaltungen zu diesem Thema. Dr. Uwe Linne und Dr. Andreas Mielcarek danke ich für die Unterstützung bei massenspektrometrischen Fragestellungen.

Der gesamten Arbeitsgruppe möchte ich für das familiäre Arbeitsklima und die tolle Zeit danken.

Ich danke meinen Vertiefungs- und Masterstudenten, Nathalie Nett, Svenja Weigel, Andreas Borowiak, Sabrina Gies, Lennart Nicke, Felix Klein, Patrick Peschke, Matthias Franz, Christoph Heger und Memduha Muratoglu bei ihrer tatkräftigen Unterstützung.

Ich danke Oliver Meckes von *eye of science* für die Erlaubnis seine rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen von *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans* und *Saccharomyces cerevisiae* in dieser Arbeit verwenden zu dürfen.

Ein besonderer und mit Sicherheit der größte Dank gilt meiner kleinen Familie, die mich in allen Belangen unterstützt und mir mit ihrer Liebe immer wieder aufzeigt, worauf es im Leben wirklich ankommt. Ich liebe euch!

Ein weiterer besonderer Dank gilt meinen Eltern und meinem Bruder für ihre immerwährende Unterstützung in allen Lebenslagen. Danke!